

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of	)	
	)	
MÉLANIE CHOPART et al.	)	Group Art Unit:
	)	
Application No.:	)	Examiner:
	)	
Filed: JANUARY 29, 2004	)	Confirmation No.: 9046
	)	
For: RECONSTRUCTED EPIDERMIS/SKIN	)	
EQUIVALENT COMPRISING A	)	
CERAMIDE 7 AND/OR 5.5 AND LIPID	)	
LAMELLAR VESICULAR	)	
COMPOSITIONS COMPRISING	)	
CERAMIDE 7 AND/OR 5.5	)	
COMPOUNDS	)	

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign applications in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

FRANCE Patent Application No. 03/01058

Filed: JANUARY 30, 2003

and

FRANCE Patent Application No. 03/01059

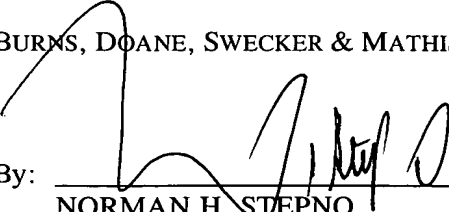
Filed: JANUARY 30, 2003

In support of this claim, enclosed are certified copies of said prior foreign applications. Said prior foreign applications were referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copies is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: JANUARY 29, 2004

By:   
NORMAN H. STEPNO  
Registration No. 22,716

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

03 01058.  
(4)

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

**04 DEC. 2003**

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**Martine PLANCHE**

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**

**SIEGE**  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>30 JAN 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>30 JAN. 2003</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> L'OREAL Myriam ALLAB - D.I.P.I 6, rue Bertrand Sincholle 92585 CLICHY cedex France	
<b>V s références pour ce dossier</b> (facultatif) OA03024/DBA			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Procédés de préparation d'un épiderme reconstruit supplémenté en céramide 7 et/ou 5.5.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		L'ORÉAL	
Prénoms			
Forme juridique		SA	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	14, rue Royale	
	Code postal et ville	75008	PARIS
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01.47.56.86.81	
N° de télécopie (facultatif)		01.47.56.73.88	
Adresse électronique (facultatif)			

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2



REMISE DES PIÈCES JAN 2003 Réservé à l'INPI  
 DATE 75 INPI PARIS  
 LIEU 0301058  
 N° D'ENREGISTREMENT  
 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 260899

<b>V s r é f é r e n c e s p o u r c e d o s s i e r :</b> (facultatif)		OA03024/DBA	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		ALLAB	
Prénom		Myriam	
Cabinet ou Société		L'ORÉAL	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6 rue Bertrand Sinholle	
	Code postal et ville	92585	CLICHY Cedex
N° de téléphone (facultatif)		01.47.56.86.81	
N° de télécopie (facultatif)		01.47.56.73.88	
Adresse électronique (facultatif)			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformati n)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,  
indiquez le nombre de pages jointes

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE**  
(Nom et qualité du signataire)  
Myriam ALLAB

30 Janvier 2003

VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI

M. ROCHET

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5, consistant à introduire au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 dans le milieu de culture dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau et/ou à appliquer  
5 topiquement sur ledit épiderme reconstruit ou ledit équivalent de peau une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5.

L'invention se rapporte encore à un épiderme reconstruit ou un équivalent de peau contenant au moins un dérivé de la famille du céramide 5.5.

10

La peau humaine est constituée de deux compartiments à savoir un compartiment profond, le derme, et un compartiment superficiel, l'épiderme.

L'épiderme est en contact avec l'environnement extérieur. Son rôle consiste à protéger l'organisme de la déshydratation et des agressions extérieures, qu'elles soient chimiques,  
15 mécaniques, physiques ou infectieuses.

L'épiderme humain naturel est composé principalement de trois types de cellules qui sont les kératinocytes, très majoritaires, les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Chacun de ces types cellulaires contribue par ses fonctions propres au rôle essentiel  
20 joué dans l'organisme par la peau.

Les cellules constituant l'épiderme sont délimitées par un domaine lipidique. Au cours de la différenciation, les phospholipides dont le rôle consiste à élaborer la structure fluide des membranes cellulaires des couches vivantes de l'épiderme, sont peu à peu  
25 remplacés par un mélange composé en majeure partie d'acides gras, de cholestérol et de sphingolipides.

Ces lipides sont organisés en phase cristal liquide lamellaire spécifiques dont l'intégrité dépend non seulement de la qualité des fractions présentes mais aussi de leur proportion  
30 respective. Cette structure lamellaire des lipides du domaine lipidique de l'épiderme est responsable de la fonction barrière épidermique.

Les lipides épidermiques sont synthétisés principalement dans l'épiderme vivant. Ils sont principalement constitués de phospholipides, de céramides (ou sphingolipides), de  
35 cholestérol, d'acides gras libres, de triglycérides, d'esters du cholestérol et d'alcanes.

Les céramides sont un des constituants essentiels des lipides épidermiques, permettant d'assurer en partie, la structure cristal liquide lamellaire de ceux ci, mais aussi la fonction barrière de l'épiderme.

5 Les céramides sont composés d'une base sphingoïde qui peut être de quatre types, sphinganine, sphingénine, phytosphingosine et 6-hydroxy-4-sphingénine, et d'un acide gras qui peut être saturé,  $\alpha$  hydroxylé ou  $\omega$  estérifié. Les différentes combinaisons possibles entre bases et acides gras conduisent à une dizaine de céramides répertoriés par Robson, K.J.; Stewart, M.E.; Michelsen, S.; Lazo, N.D.; Downing, D.T., 6-hydroxy-4-sphingénine in human epidermal ceramides, dans J. Lipid Res. 1994 35 :2060-2068; et  
10 Chopart M., Castiel-Higounenc I., Arbey E., Guey C., Gaetani Q., Schmidt R., The Normal Human stratum corneum: a new ceramide profile, Perspectives in Percutaneous Penetration, 8th International Conference, Antibes Juan-Les Pins – France, April 2-6, 2002.

15

Des modèles plus ou moins proches de la peau humaine ont pu être mis au point. On peut citer par exemple les modèles décrits dans les demandes de brevets EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904 et FR-A-2792650. Ces documents  
20 sont incorporés ici par référence

De manière très générale, les modèles de peau reconstruite décrits dans ces documents comprennent des kératinocytes humains associés ou non à d'autres cellules de la peau comme les mélanocytes et/ou les cellules de Langerhans, déposés sur un support, souvent un équivalent de derme, et cultivés dans des conditions telles qu'ils entrent dans  
25 un programme de différenciation aboutissant à la formation d'un équivalent d'épiderme. Les équivalents de derme décrits à ce jour sont soit des membranes artificielles comme par exemple les filtres de marque Millipore, des substituts sous-cutanés à base de collagène, du plastique ou tout autre support compatible avec la viabilité cellulaire, soit  
30 des supports plus élaborés pour les rendre plus proches du derme naturel, comme le derme préalablement désépidermisé ou des lattices mixtes collagène/fibroblastes. Dans les lattices mixtes collagène/fibroblastes l'association de collagène natif et de fibroblastes humains isolés conduit à l'obtention d'un équivalent de derme mimant un derme qui n'a pas subi l'action du temps.

35



Les céramides sont un des constituants essentiels des lipides épidermiques, permettant d'assurer en partie, la structure cristal liquide lamellaire de ceux ci, mais aussi la fonction barrière de l'épiderme.

- 5 Les céramides sont composés d'une base sphingoïde qui peut être de quatre types, sphinganine, sphingénine, phytosphingosine et 6-hydroxy-4-sphingénine, et d'un acide gras qui peut être saturé,  $\alpha$  hydroxylé ou  $\omega$  estérifié. Les différentes combinaisons possibles entre bases et acides gras conduisent à une dizaine de céramides répertoriés par Robson, K.J.; Stewart, M.E.; Michelsen, S.; Lazo, N.D.; Downing, D.T., 6-hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides, dans J. Lipid Res. 1994 35 :2060-2068; et
- 10 Chopart M., Castiel-Higounenc I., Arbey E., Guey C., Gaetani Q., Schmidt R., The Normal Human stratum corneum: a new ceramide profile, Perspectives in Percutaneous Penetration, 8th International Conference, Antibes Juan-Les Pins – France, April 2-6, 2002.

15

Des modèles plus ou moins proches de la peau humaine ont pu être mis au point. On peut citer par exemple les modèles décrits dans les demandes de brevets EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904 et FR-A-2792650.

20

- De manière très générale, les modèles de peau reconstruite décrits dans ces documents comprennent des kératinocytes humains associés ou non à d'autres cellules de la peau comme les mélanocytes et/ou les cellules de Langerhans, déposés sur un support,
- 25 souvent un équivalent de derme, et cultivés dans des conditions telles qu'ils entrent dans un programme de différenciation aboutissant à la formation d'un équivalent d'épiderme. Les équivalents de derme décrits à ce jour sont soit des membranes artificielles comme par exemple les filtres de marque Millipore, des substituts sous-cutanés à base de collagène, du plastique ou tout autre support compatible avec la viabilité cellulaire, soit
- 30 des supports plus élaborés pour les rendre plus proches du derme naturel, comme le derme préalablement désépidermisé ou des lattices mixtes collagène/fibroblastes. Dans les lattices mixtes collagène/fibroblastes l'association de collagène natif et de fibroblastes humains isolés conduit à l'obtention d'un équivalent de derme mimant un derme qui n'a pas subi l'action du temps.

35

Les modèles de peaux reconstruites présentent généralement une fonction barrière déficiente (M. Ponc, P.J.J. Wauben-Penris, A. Burger, J. Kempenarr, H. E. Boddé, Skin Pharmacol 1990; 3: pp.126-135). Cette déficience est en grande partie due à d'importantes modifications du profil céramidique de ce modèle qui ont été observées par rapport à un épiderme humain normal.

Il est connu du document FR 2 811 556 d'utiliser de la 6-hydroxy-4-sphingénine pour augmenter la fonction barrière des peaux reconstruites.

Toutefois, en utilisant de la 6-hydroxy-4-sphingénine on ne peut contrôler la nature du céramide qui va être obtenu *in situ* suite à son association avec un acide gras au niveau de l'épiderme. La 6-hydroxy-4-sphingénine est en effet la base sphingoïde constitutive de plusieurs céramides: céramides STAR, 4, 5.5 et 7 ("The Normal Human stratum corneum: a new ceramide profile" M. Chopart *et al.* Prospectives in Percutaneous Penetration, 8th International Conference Antibes Juan-Les Pins, France April 2-6, 2002). En outre, une peau reconstruite est une structure fragile qui ne peut être maintenue en survie que durant un temps limité (environ 1 mois). Tout gain de temps permettant à une peau reconstruite d'acquérir une fonction barrière est donc un paramètre important en rapport à sa durée de vie.

Afin d'améliorer le profil lipidique des épidermes reconstruits, il est également connu d'ajouter de l'acide ascorbique ou vitamine C (*J. Invest. Dermatol.* 109 :348-355, 1997) ou des dérivés d'acide ascorbique (FR 2 807 320) dans le milieu de culture.

Toutefois, en raison de sa structure chimique (alpha-cétolactone), l'acide ascorbique est très sensible à certains paramètres de l'environnement comme la lumière, la chaleur et les milieux aqueux, en particulier les milieux alcalins et/ou aérobies. En raison de ces problèmes de stabilité, il est nécessaire d'utiliser de fortes concentrations d'acide ascorbique pour observer l'effet sur la peau d'une composition le contenant. En outre, en apportant dans le milieu de culture de l'acide ascorbique ou l'un de ses dérivés on ne peut pas contrôler la nature exacte du céramide qui va être synthétisé *in situ*.

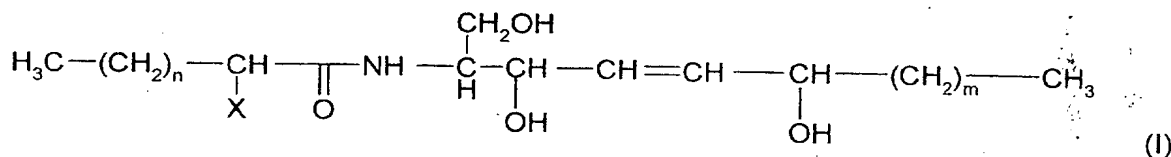
Il subsiste donc le besoin de disposer d'autres procédés permettant d'obtenir plus rapidement des modèles de peaux reconstruites dont le profil céramidiques est amélioré, avec une fonction barrière se rapprochant de l'épiderme humain normal.

La demanderesse a maintenant découvert un nouveau procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5, consistant à introduire dans le milieu de culture au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 et/ou à appliquer topiquement sur ledit épiderme reconstruit ou

ledit équivalent de peau une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5.

5 Grâce au nouveau procédé de préparation on peut maintenant obtenir un équivalent de peau, ou une peau reconstruite, supplémenté en au moins un dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I), de préférence un dérivé de céramide 7 de formule (I), en contrôlant exactement la nature du céramide qui voit sa proportion augmentée dans ledit équivalent de peau ou ladite peau reconstruite.

10 Un premier objet de la présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I), consistant à introduire au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 dans le milieu de culture contenant ledit épiderme reconstruit ou ledit équivalent de peau et/ou à appliquer topiquement sur la surface dudit épiderme  
15 reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) suivante:



20

dans laquelle :

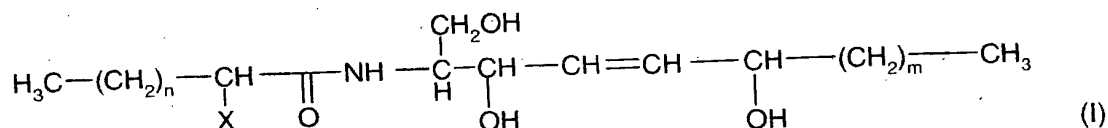
- X représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle (OH);  
avantageusement un groupement hydroxyle ;
- n est compris entre 19 et 29 carbones, de préférence entre 21 et 27 carbones,  
25 avantageusement égal à 21, 22 ou 23 carbones ;
- m est compris entre 9 et 19 carbones, de préférence entre 9 et 15 carbones,  
avantageusement égal à 11, 12 ou 13 carbones.

30 Les dérivés de céramide 5.5 de formule (I) sont ceux pour lesquels X représente un groupement hydrogène.

Les dérivés de céramide 7 de formule (I) sont ceux pour lesquels X représente un groupement hydroxyle.

ledit équivalent de peau une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5.

- 5 Grâce au nouveau procédé de préparation on peut maintenant obtenir un équivalent de peau, ou une peau reconstruite, supplémenté en au moins un dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I), de préférence un dérivé de céramide 7 de formule (I), en contrôlant exactement la nature du céramide qui voit sa proportion augmentée dans ledit équivalent de peau ou ladite peau reconstruite.
- 10 Un premier objet de la présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I), consistant à introduire au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 dans le milieu de culture contenant ledit épiderme reconstruit ou ledit équivalent de peau et/ou à appliquer topiquement sur la surface dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture une
- 15 composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) suivante:



- 20 dans laquelle :
- X représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle (OH); avantageusement un groupement hydroxyle ;
  - n est compris entre 19 et 29 carbones, de préférence entre 21 et 27 carbones, avantageusement égal à 21, 22 ou 23 carbones ;
  - 25 - m est compris entre 9 et 19 carbones, de préférence entre 9 et 15 carbones, avantageusement égal à 11, 12 ou 13 carbones.

Les dérivés de céramide 5.5 de formule (I) sont ceux pour lesquels X représente un groupement hydrogène.

- 30 Les dérivés de céramide 7 de formule (I) sont ceux pour lesquels X représente un groupement hydroxyle.

Suivant un mode de réalisation préféré les composés de formule (I) sont ceux pour lesquels n est compris entre 21 et 27 et m est compris entre 9 et 15.

35

Suivant un autre mode de réalisation préféré les composés de formule (I) sont ceux pour lesquels n est égal à 21, 22 ou 23 et m est égal à 11, 12 ou 13.

Le céramide 7, tel que décrit par Robson *et al.*, dans J. Lipid Res. 1994 35 :2060-2068, correspondant au composé de formule (I) pour lequel n égal à 21 et m égal à 11, est particulièrement préféré suivant l'invention.

- 5 Suivant les procédés de l'invention, la concentration d'au moins un dérivé de formule (I) introduit dans le milieu de culture est comprise entre 10 g/l et  $10^{-6}$  g/l, de préférence entre 1g/l et  $10^{-5}$  g/l, avantageusement de  $10^{-1}$  g/l à  $10^{-5}$  g/l de milieu de culture.

- 10 L'introduction dans le milieu de culture d'au moins un dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I) peut se faire par différents procédés qui seront choisis de manière telle que le dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I) soit au final solubilisé dans le milieu de culture. En effet, du fait de la structure lipophile des dérivés de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I), on comprend que cette dissolution dans le milieu de culture ne soit pas a priori évidente. Suivant une première variante, le dit dérivé est dissout au préalable dans un solvant. Dans une autre variante, le dit dérivé est associé au préalable avec une autre molécule capable de le véhiculer. Une autre variante consiste à réaliser au préalable une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins ledit dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5. Ces compositions, associations et/ou solvations ainsi obtenues au préalable sont alors introduites dans le milieu de culture.

- 20 Le solvant choisi doit être capable de solubiliser le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I). La solution obtenue est alors introduite dans le milieu de culture. La quantité de solvant introduite dans le milieu de culture est telle qu'elle ne gêne pas le développement normal de l'épiderme et son homéostasie. Avantageusement, le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) peut être dissout dans de l'éthanol ou le DMSO à la concentration voulue, le rapport finale en solvant introduit dans le milieu de culture ne devant pas dépasser 1/1000.

- 30 Le procédé suivant l'invention peut également consister à introduire dans le milieu de culture une association préparée au préalable contenant au moins un dit dérivé et au moins une molécule capable de véhiculer et de rendre biodisponible le dit dérivé au sein de l'épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau à partir du milieu de culture.

- 35 Les molécules capables de véhiculer et de rendre biodisponible le dit dérivé sont avantagéusement choisies parmi le BSA (Bovine Serum Albumine) ou albumine de sérum de bœuf et/ou un composé de la famille des cyclodextrines ou un dérivé de la famille des cyclodextrines permettant un transport et une solubilisation dans le milieu de culture de façon similaire.

Lorsque le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) est associé à du BSA, le ratio molaire par rapport au BSA est compris par exemple entre 1/1000 à 1/3, préférentiellement 1/100 à 1/5. La concentration de BSA pouvant être introduite dans le milieu de culture doit être inférieure ou égale à 100  $\mu\text{mol/l}$ , de préférence comprise entre 0.5  $\mu\text{mol/l}$  et 100  $\mu\text{mol/l}$ , préférentiellement entre 10  $\mu\text{mol/l}$  et 50  $\mu\text{mol/l}$ .

Lorsque le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) est associé à au moins un composé de la famille des cyclodextrines, avantageusement le HPBCD ou 12-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, ou un dérivé de la famille des cyclodextrines permettant un transport et une solubilisation dans le milieu de culture de façon similaire, la concentration approximative de céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) pourra par exemple être comprise entre 0.01 nmol/ $\mu\text{l}$  et 100 nmol/ $\mu\text{l}$ , préférentiellement entre 0.1 nmol/ $\mu\text{l}$  et 10 nmol/ $\mu\text{l}$  et plus particulièrement entre 1 nmol/ $\mu\text{l}$  et 5 nmol/ $\mu\text{l}$  d'une solution à 50% en cyclodextrines (dilué dans de l'eau). Cette concentration sera bien sûr adaptée en fonction du dérivé choisi et de la composition annexe du milieu de culture lui-même. Cette préparation est ensuite introduite dans le milieu de culture, le volume ainsi introduit étant adapté à la concentration finale voulue en céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I).

Les associations précédemment décrites formés par le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) et un véhicule, peut comprendre en outre :

- un agent antioxydant, avantageusement le D.L  $\alpha$  Tocophérol acétate à une concentration inférieure ou égale à 50  $\mu\text{mol/l}$ , de préférence comprise entre 0.5  $\mu\text{mol/l}$  et 50  $\mu\text{mol/l}$  de milieu de culture, avantageusement 21  $\mu\text{mol/l}$  de milieu de culture, et/ou
- un agent transporteur cellulaire, avantageusement la L-Carnitine à une concentration inférieure ou égale à 100  $\mu\text{mol/l}$ , de préférence comprise entre 0.5 et 100  $\mu\text{mol/l}$ , avantageusement 10  $\mu\text{mol/l}$  de milieu de culture.

Lorsque le procédé suivant l'invention consiste à introduire dans le milieu de culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5, ladite composition comprend de préférence une dispersion, dans une phase aqueuse externe, de vésicules formées par des phases lamellaires lipidiques séparées les unes des autres par des couches hydrophiles, lesdites phases lamellaires comprenant au moins un lipide amphiphile, et au moins ledit dérivé de formule (I) inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques.

Les concentrations précitées pourront être adaptées (augmentées comme diminuées) de manière à rester dans une gamme de concentration telle qu'elles ne gênent pas le développement normal de l'épiderme et son homéostasie.

- 5 Le milieu de culture selon l'invention est un milieu bien connu de l'homme du métier. Il s'agit en particulier d'un milieu tel décrit dans l'un des documents suivants incorporés ici par référence EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904 et FR-A-2792650 FR 2 811 556.

10

Suivant un autre mode de réalisation du procédé suivant l'invention, la peau reconstruite supplémentée en au moins un céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) est obtenue par application topique sur la surface des épidermes en culture d'une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide

15

7 et/ou 5.5.  
Avantageusement, la dite composition comprend une dispersion, dans une phase aqueuse externe, de vésicules formées par des phases lamellaires lipidiques séparées les unes des autres par des couches hydrophiles, lesdites phases lamellaires comprenant au moins un lipide amphiphile, et au moins ledit dérivé de formule (I) inclus

20

dans lesdites phases lamellaires lipidiques.  
Par vésicule ou dispersion vésiculaire on entend une dispersion de lipides amphiphiles formant au contact de l'eau ou d'un milieu hydrophile, des particules dont le cœur est hydrophile (eau ou mélange hydrophile) et dont la paroi est constituée de bicouches de

25

type cristal liquide lamellaire. Ces vésicules sont communément appelées Liposomes. Ils sont principalement constitués de phospholipides, naturels ou synthétiques, hydrogénés ou non. Les Niosomes, quant à eux, sont constitués de tensioactifs non ioniques, éventuellement associés à du cholestérol et/ou un tensioactif ionique.

30

Les vésicules selon l'invention sont formées par, ou comprennent, de un à vingt cinq feuillets de phases lamellaires sensiblement concentriques de type bimoléculaires.

Les vésicules suivant l'invention peuvent être soit des niosomes du type de ceux décrits dans les demandes EP 0 958 856, EP 0 582 503, EP 0 455 528, EP 0 043 327, soit des

35

liposomes de type classique. Les dérivés de formule (I) suivant l'invention deviennent, dans ce type de structure, l'un des constituants des phases lamellaires.

Les concentrations précitées pourront être adaptées (augmentées comme diminuées) de manière à rester dans une gamme de concentration telle qu'elles ne gênent pas le développement normal de l'épiderme et son homéostasie.

- 5 Le milieu de culture selon l'invention est un milieu bien connu de l'homme du métier. Il s'agit en particulier d'un milieu tel décrit dans l'un des documents suivants EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904 et FR-A-2792650 FR 2 811 556.
- 10 Suivant un autre mode de réalisation du procédé suivant l'invention, la peau reconstruite supplémentée en au moins un céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) est obtenue par application topique sur la surface des épidermes en culture d'une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5.
- 15 Avantageusement, la dite composition comprend une dispersion, dans une phase aqueuse externe, de vésicules formées par des phases lamellaires lipidiques séparées les unes des autres par des couches hydrophiles, lesdites phases lamellaires comprenant au moins un lipide amphiphile, et au moins ledit dérivé de formule (I) inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques.
- 20 Par vésicule ou dispersion vésiculaire on entend une dispersion de lipides amphiphiles formant au contact de l'eau ou d'un milieu hydrophile, des particules dont le cœur est hydrophile (eau ou mélange hydrophile) et dont la paroi est constituée de bicouches de type cristal liquide lamellaire. Ces vésicules sont communément appelées Liposomes. Ils
- 25 sont principalement constitués de phospholipides, naturels ou synthétiques, hydrogénés ou non. Les Niosomes, quant à eux, sont constitués de tensioactifs non ioniques, éventuellement associés à du cholestérol et/ou un tensioactif ionique.
- 30 Les vésicules selon l'invention sont formées par, ou comprennent, de un à vingt cinq feuilletts de phases lamellaires sensiblement concentriques de type bimoléculaires.
- Les vésicules suivant l'invention peuvent être soit des niosomes du type de ceux décrits dans les demandes EP 0 958 856, EP 0 582 503, EP 0 455 528, EP 0 043 327, soit des liposomes de type classique. Les dérivés de formule (I) suivant l'invention deviennent,
- 35 dans ce type de structure, l'un des constituants des phases lamellaires.



Le taux de dérivé de formule (I) va de 0.001% à 30%, préférentiellement 0.001% à 10%, avantageusement de 0.001% à 5% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant les vésicules.

- 5 Le rapport en poids entre la quantité de phase lipidique et la quantité de phase aqueuse de la dispersion est compris entre 1/1000 et 300/1000.

Les dispersions vésiculaires selon l'invention peuvent être préparées suivants de nombreux procédés bien connus de l'homme du métier.

- 10 Par exemple, selon un premier procédé, on dissout tous les lipides amphiphiles, y compris les dérivés de formule (I) suivant l'invention, dans un solvant volatil un solvant, on forme un film mince lipidique sur les parois d'un flacon par évaporation du solvant, puis on reprend le film lipidique dans une solution aqueuse d'octylglucoside pour former des micelles mixtes octylglucoside/lipides vésiculaires. Cette solution est ensuite dialysée  
15 contre de l'eau distillée. Les liposomes se forment au fur et à mesure que l'octylglucoside est dialysé. Ce procédé est particulièrement adapté lorsque l'on ne dispose que d'une très faible quantité de dérivés de formule (I).

- Cette méthode n'est cependant pas limitative et les autres méthodes utilisées pour former des dispersions vésiculaires (liposomes) sont envisageables (Bangham, par  
20 injection d'éthanol, par fusion, par « reverse phase »...). On peut encore citer la méthode décrite dans le brevet EP 0 582 503 B1.

- L'incorporation d'au moins un dit dérivé de formule (I) dans les phases lamellaires lipidiques permet obtenir l'effet recherché sur l'amélioration de la fonction barrière de  
25 l'épiderme reconstruit tout en prenant en compte les caractéristiques intrinsèques des dérivés de formule (I): grosses molécules, difficiles à formuler et à stabiliser.

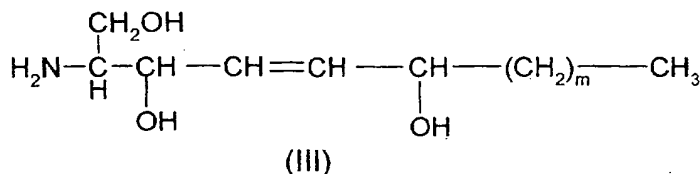
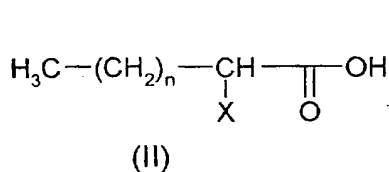
- Une dispersion vésiculaire selon l'invention permet en outre d'améliorer la bio-disponibilité des dérivés de formule (I) au sein des couches de l'épiderme. Ladite biodisponibilité est améliorée car la formule de la dispersion vésiculaire suivant l'invention  
30 représente une formule proche des structures lipidiques multicouches de l'épiderme qui représentent la cible desdits dérivés de formule (I).

En outre, les dérivés de formule (I) présentent un caractère amphiphile marqué ce qui présente l'avantage de faciliter leur incorporation au sein de l'épiderme.

- 35 Par biodisponibilité, on entend au sens de l'invention, la pénétration d'un actif dans la peau pour que celui-ci soit biologiquement disponible pour les éléments vivants de la

peau, et en particulier l'épiderme. Ainsi, l'augmentation de la biodisponibilité d'un actif a pour effet d'augmenter le taux d'actif qui va arriver jusqu'à l'épiderme vivant.

- En outre, les compositions selon l'invention permettent de rendre disponible le céramide 5.5 et/ 7 directement au sein de la couche cornée là où sans formulation adéquate, le dit céramide ne pénètre pas la couche cornée. Ainsi, les compositions selon l'invention permettent de combler directement dans la couche cornée un déficit en céramide 5.5 et/ou 7.
- La composition peut être appliquée topiquement sur la surface des épidermes en culture en une quantité comprise entre 0.5  $\mu$ l et 10  $\mu$ l, préférentiellement 1  $\mu$ l à 5  $\mu$ l et plus particulièrement de 2  $\mu$ l par  $\text{cm}^2$  de surface d'épiderme reconstruit. La composition est ensuite généralement rendue homogène à la surface des épidermes par étalement à l'aide d'une spatule.
- Les dérivés de formule (I) suivant l'invention peuvent être isolés par CCM à partir de prélèvements lipidiques réalisés par des méthodes non invasives sur des volontaires sains suivant une méthode bien connue de l'homme du métier. Ces prélèvements lipidiques sont ensuite soumis à un traitement préparatif et analytique permettant de d'isoler les dérivés de formule (I) des autres lipides et de les purifier. Ces méthodes sont par exemple décrites dans le document JP2000/143,598 ou M. Chopart *et al.* Prospectives in Percutaneous Penetration, 8th International Conference Antibes Juan- Les Pins, France April 2-6, 2002 et le document JP2000/143,598 de Kanebo).
- Les dérivés de formule (I) peuvent être également préparés selon des procédés de synthèse organique classique, par exemple par une réaction de condensation entre un acide gras de formule (II) et une base de formule (III), de préférence la base 6-hydroxy-4-sphingénine.



X, n et m conservent les définitions données précédemment.

La base 6 hydroxy-4-sphingénine peut être préparée selon des procédés de synthèse

décrits et bien connus de l'homme du métier, par exemple tels que décrits ou inspirés de "Mendeleev, Commun. 108-110, 1992" ou "Tetrahedron Letters, 34, n°7, 1191-1194, 1993".

Les acides gras sont largement disponibles commercialement.

- 5 Une autre méthode de synthèse organique classique, décrite dans le document JP2000/143,598, consiste en une réaction d'oxydation en position 6 de la base à partir d'un précurseur non oxydé.

10 Le dérivé de formule (I) pourra être introduit à tout moment de la vie de l'équivalent de peau (au maximum 2 mois) qu'il soit à l'état d'immersion ou d'émersion suivant l'un au moins des procédés suivant l'invention par application topique et/ou par introduction dans le milieu de culture. Préférentiellement, le céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) pourra être apporté à l'équivalent de peau entre le 1<sup>o</sup> jour de culture et le trentième jour de culture et plus particulièrement entre le quatrième jour et le vingt-et-unième jour.

15 La supplémentation directe dans le milieu de culture pourra avoir lieu à chaque changement du milieu de culture qui intervient généralement tous les deux jours. Cette supplémentation pourra être augmentée ou diminuée du fait des changements du milieu de culture intervenant en fonction de l'effet voulu et des impératifs des études ou de certains procédés de fabrication.

20 La supplémentation par voie topique pourra avoir lieu préférentiellement tous les deux jours. Là encore cette fréquence sera adaptée, allant d'une supplémentation toutes les heures à toutes les semaines, en fonction des effets voulus et des impératifs des études ou de certains procédés de fabrication.

25 Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé est mis en œuvre sur le modèle d'épiderme reconstruit EPISKIN™.

30 Les composés de formule (I) tels que définis précédemment présentent donc le grand avantage de mettre à la disposition des chercheurs, un équivalent de peau nouveau, supplémenté en au moins un dérivé de formule (I). Suivant le procédé de l'invention, la quantité de céramide 7 et/ou 5.5 pouvant être introduite au sein du stratum corneum de la peau reconstruite représente de 0.1 µg à 50 µg par mg de stratum corneum, avantageusement de 0.5 µg à 15 µg par mg de stratum corneum.

35

De préférence, l'équivalent de peau ou peau reconstruite supplémentée en au moins un dérivé de la famille du céramide 5.5 ou 7 de formule (I) obtenu suivant l'un des procédés de l'invention contient une quantité de céramide 5.5 ou 7 de formule (I) supérieure à 1% des céramides totaux.

La présente invention est également basée sur l'observation de la demanderesse suivant laquelle les peaux reconstruites présentent un net déficit en céramides les plus polaires qui se traduit par un déficit en bases sphingoïdes 6-hydroxy-4-sphingénine composant ces céramides au profit de la base 4-sphingénine (appelée aussi sphingosine) essentiellement. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1. La Figure 1 présente une comparaison des profils relatifs des bases sphingoides issues des céramides et dérivés de Stratum Humain Normal et EPISKIN<sup>TM</sup>.

La demanderesse a découvert que les dérivés de la famille du céramide 5.5 de formule (I) avec X= H tel que défini précédemment permettent de renforcer la fonction barrière de la peau reconstruite, aussi appelée équivalent de peau.

En effet, on a constaté que la supplémentation desdites peaux reconstruites en au moins un dérivé de formule (I) avec X= H tel que défini précédemment permet d'améliorer l'aspect et les propriétés barrière de ces dites peaux, et de les rendre plus proches structurellement des peaux normales.

On peut ainsi obtenir un nouveau équivalent de peau, ou nouvelle peau reconstruite, contenant au moins un dérivé de céramide 5.5 de formule (I) avec X= H tel que défini précédemment.

Un second objet de la présente invention se rapporte donc à un équivalent de peau ou peau reconstruite contenant au moins un dérivé de formule (I) avec X= H tel que défini précédemment, n et m conservant par ailleurs les mêmes définitions que celles données précédemment. De préférence, l'équivalent de peau ou peau reconstruite contient une quantité de céramide 5.5 de formule (I) supérieure à 1% des céramides totaux.

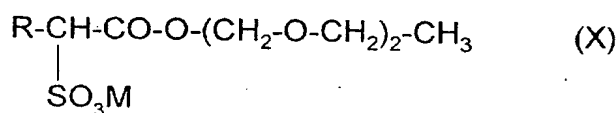
Le dit équivalent de peau ou la dite peau reconstruite contenant au moins un dérivé de formule (I) avec X = H peut être obtenu par la mise en œuvre de l'un des procédés tels que décrits précédemment.

Les lipides amphiphiles constitutifs des dispersions vésiculaires suivant l'invention sont bien connus de l'homme du métier. Par exemple, ces lipides amphiphiles peuvent être à base de phospholipides naturels ou de synthèse, hydrogénés ou non et/ou de tensioactifs non ioniques pouvant être associés ou non à du cholestérol.

- 5 Les lipides amphiphiles ioniques, cationiques ou anioniques, ou non ioniques préférés suivant l'invention sont choisis parmi ceux décrits dans les documents EP 0 582 503 A1, FR 2 485 921, et FR 2 315 991 qui sont incorporés ici par référence.

Les lipides amphiphiles anioniques (B) préférés sont choisis dans le groupe formé par:

- 10 - les sels alcalins du dicétyl- et du dimyristylphosphate ;  
 - les sels alcalins du cholestérol sulfate ;  
 - les sels alcalins du cholestérol phosphate ;  
 - les lipoaminoacides et leurs sels tels que les acylglutamates mono- et di-sodiques  
 15 comme le sel disodique de l'acide N-stéaroyl L-glutamique commercialisé sous la dénomination Acylglutamate HS21 par la société AJINOMOTO ;  
 - les sels de sodium de l'acide phosphatidique ;  
 - les phospholipides ;  
 - les dérivés alkylsulfoniques notamment de formule (X) :



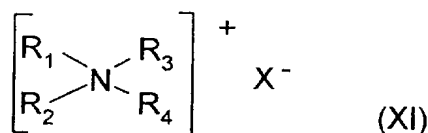
20

dans laquelle R représente des radicaux alkyle en C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, en particulier les radicaux C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> et C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> pris en mélange ou séparément et M est un métal alcalin ou alcalino-terreux tel que le sodium ; et leurs mélanges.

- 25 Les lipides amphiphiles cationiques selon l'invention sont de préférence choisis dans le groupe formé par les sels d'ammonium quaternaire, les amines grasses et leurs sels.

Les sels d'ammonium quaternaires sont par exemple :

- ceux qui présentent la formule générale (XI) suivante;



30

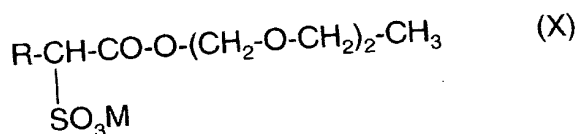
dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>4</sub>, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un radical aliphatique, linéaire ou ramifié, comportant de 1 à 30

Les lipides amphiphiles constitutifs des dispersions vésiculaires suivant l'invention sont bien connus de l'homme du métier. Par exemple, ces lipides amphiphiles peuvent être à base de phospholipides naturels ou de synthèse, hydrogénés ou non et/ou de tensioactifs non ioniques pouvant être associés ou non à du cholestérol.

- 5 Les lipides amphiphiles ioniques, cationiques ou anioniques, ou non ioniques préférés suivant l'invention sont choisis parmi ceux décrits dans les documents EP 0 582 503 A1, FR 2 485 921, et FR 2 315 991.

Les lipides amphiphiles anioniques (B) préférés sont choisis dans le groupe formé par:

- 10 - les sels alcalins du dicétyl- et du dimyristylphosphate ;  
 - les sels alcalins du cholestérol sulfate ;  
 - les sels alcalins du cholestérol phosphate ;  
 - les lipoaminoacides et leurs sels tels que les acylglutamates mono- et di-sodiques  
 comme le sel disodique de l'acide N-stéaroyl L-glutamique commercialisé sous la  
 15 dénomination Acylglutamate HS21 par la société AJINOMOTO ;  
 - les sels de sodium de l'acide phosphatidique ;  
 - les phospholipides ;  
 - les dérivés alkylsulfoniques notamment de formule (X) :



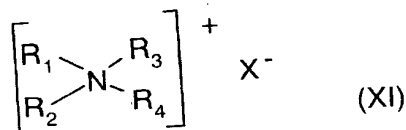
20

dans laquelle R représente des radicaux alkyle en C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, en particulier les radicaux C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> et C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> pris en mélange ou séparément et M est un métal alcalin ou alcalino-terreux tel que le sodium ; et leurs mélanges.

- 25 Les lipides amphiphiles cationiques selon l'invention sont de préférence choisis dans le groupe formé par les sels d'ammonium quaternaire, les amines grasses et leurs sels.

Les sels d'ammonium quaternaires sont par exemple :

- ceux qui présentent la formule générale (XI) suivante;

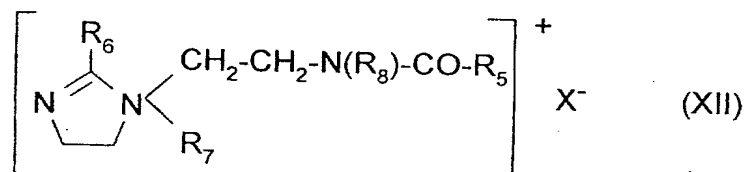


30

dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>4</sub>, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un radical aliphatique, linéaire ou ramifié, comportant de 1 à 30

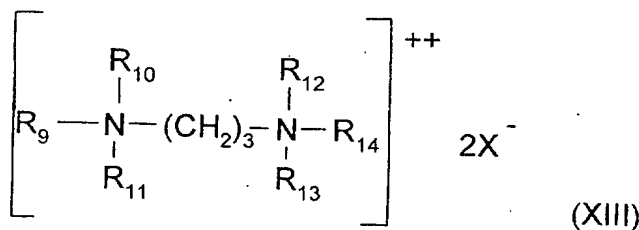
atomes de carbone, ou un radical aromatique tel que aryle ou alkylaryle. Les radicaux aliphatiques peuvent comporter des hétéroatomes tels que notamment l'oxygène, l'azote, le soufre, les halogènes. Les radicaux aliphatiques sont par exemple choisis parmi les radicaux alkyle, alcoxy, polyoxyalkylène(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alkylamide, alkyl(C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>)amido alkyle(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alkyl(C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>)acétate, hydroxyalkyle, comportant environ de 1 à 30 atomes de carbone; X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)sulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates,

- 10 - les sels d'ammonium quaternaire de l'imidazolinium, comme par exemple celui de formule (XII) suivante:



dans laquelle R<sub>5</sub> représente un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone par exemple dérivés des acides gras du suif, R<sub>6</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ou un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone, R<sub>7</sub> représente un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkylsulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates. De préférence, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> désignent un mélange de radicaux alcényle ou alkyle comportant de 12 à 21 atomes de carbone par exemple dérivés des acides gras du suif, R<sub>7</sub> désigne méthyle, R<sub>8</sub> désigne hydrogène. Un tel produit est par exemple commercialisé sous la dénomination «REWOQUAT W 75» par la société REWO,

- 25 - les sels de diammonium quaternaire de formule (XIII) suivante;

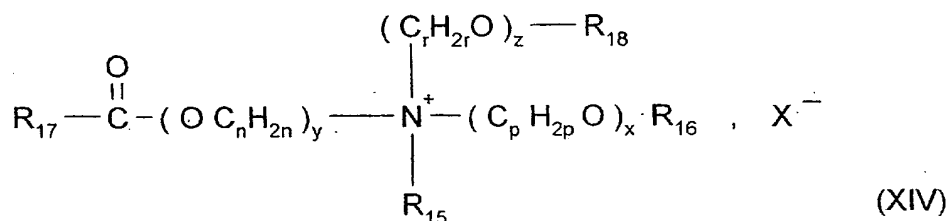


dans laquelle R<sub>9</sub> désigne un radical aliphatique comportant environ de 16 à 30 atomes de carbone, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> et R<sub>14</sub>, identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène ou un radical alkyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone, et

X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, acétates, phosphates, nitrates et méthylsulfates. De tels sels de diammonium quaternaire comprennent notamment le dichlorure de propane-sulfate diammonium.

- 5 - les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester.

Les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester utilisables selon l'invention sont par exemple ceux qui répondent à la formule (XIV) suivante :



dans laquelle :

- R<sub>15</sub> est choisi parmi les radicaux alkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> et les radicaux hydroxyalkyles ou dihydroxyalkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ;
- R<sub>16</sub> est choisi parmi :
  - 15 • le radical R<sub>19</sub>-CO- ;
  - les radicaux R<sub>20</sub> hydrocarbonés en C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub> linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
  - l'atome d'hydrogène ;
- R<sub>18</sub> est choisi parmi :
  - 20 • le radical R<sub>19</sub>-CO- ;
  - les radicaux R<sub>22</sub> hydrocarbonés en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
  - l'atome d'hydrogène ;
- R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> et R<sub>21</sub>, identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en C<sub>7</sub>-C<sub>21</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
- 25 - n, p et r, identiques ou différents, sont des entiers valant de 2 à 6 ;
- y est un entier valant de 1 à 10 ;
- x et z, identiques ou différents, sont des entiers valant de 0 à 10 ;
- X<sup>-</sup> est un anion simple ou complexe, organique ou inorganique ;
- 30 sous réserve que la somme x + y + z vaut de 1 à 15 , que lorsque x vaut 0 alors R<sub>16</sub> désigne R<sub>20</sub> et que lorsque z vaut 0 alors R<sub>18</sub> désigne R<sub>22</sub>.



Les radicaux alkyles  $R_{15}$  peuvent être linéaires ou ramifiés et plus particulièrement linéaires.

De préférence  $R_{15}$  désigne un radical méthyle, éthyle, hydroxyéthyle ou dihydroxypropyle et plus particulièrement un radical méthyle ou éthyle.

5 Avantageusement, la somme  $x + y + z$  vaut de 1 à 10.

Lorsque  $R_{16}$  est un radical  $R_{20}$  hydrocarboné, il peut être long et avoir de 12 à 22 atomes de carbone ou court et avoir de 1 à 3 atomes de carbone.

Lorsque  $R_{18}$  est un radical  $R_{22}$  hydrocarboné, il a de préférence 1 à 3 atomes de carbone.

10 Avantageusement,  $R_{17}$ ,  $R_{19}$  et  $R_{21}$ , identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en  $C_{11}$ - $C_{21}$ , linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés, et plus particulièrement parmi les radicaux alkyle et alcényle en  $C_{11}$ - $C_{21}$ , linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés.

De préférence,  $x$  et  $z$ , identiques ou différents, valent 0 ou 1.

15 Avantageusement,  $y$  est égal à 1.

De préférence,  $n$ ,  $p$  et  $r$ , identiques ou différents, valent 2 ou 3 et encore plus particulièrement sont égaux à 2.

L'anion est de préférence un halogénure (chlorure, bromure ou iodure) ou un alkylsulfate plus particulièrement méthylsulfate. On peut cependant utiliser le méthanesulfonate, le phosphate, le nitrate, le tosylate, un anion dérivé d'acide organique tel que l'acétate ou le lactate ou tout autre anion compatible avec l'ammonium à fonction ester.

L'anion  $X^-$  est encore plus particulièrement le chlorure ou le méthylsulfate.

On utilise plus particulièrement les sels d'ammonium de formule (XIV) dans laquelle :

25 -  $R_{15}$  désigne un radical méthyle ou éthyle,

-  $x$  et  $y$  sont égaux à 1 ;

-  $z$  est égal à 0 ou 1 ;

-  $n$ ,  $p$  et  $r$  sont égaux à 2 ;

-  $R_{16}$  est choisi parmi :

30 • le radical  $R_{19}$ -CO- ;

• les radicaux méthyle, éthyle ou hydrocarbonés en  $C_{14}$ - $C_{22}$  ;

• l'atome d'hydrogène ;

-  $R_{18}$  est choisi parmi :

• le radical  $R_{21}$ -CO- ;

35 • l'atome d'hydrogène ;

- R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> et R<sub>21</sub>, identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés et de préférence parmi les radicaux alkyles et alcényle en C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés:

5   Avantageusement, les radicaux hydrocarbonés sont linéaires.

On peut citer par exemple les composés de formule (XIV) tels que les sels (chlorure ou méthylsulfate notamment) de diacyloxyéthyl diméthyl ammonium, de diacyloxyéthyl hydroxyéthyl méthyl ammonium, de monoacyloxyéthyl dihydroxyéthyl méthyl ammonium,  
10 de triacyloxyéthyl méthyl ammonium, de monoacyloxyéthyl hydroxyéthyl diméthyl ammonium et leurs mélanges. Les radicaux acyles ont de préférence 14 à 18 atomes de carbone et proviennent plus particulièrement d'une huile végétale comme l'huile de palme ou de tournesol. Lorsque le composé contient plusieurs radicaux acyles, ces derniers peuvent être identiques ou différents.

15

Ces produits sont obtenus par exemple par estérification directe de la triéthanolamine, de la triisopropanolamine, d'alkyldiéthanolamine ou d'alkyldiisopropanolamine éventuellement oxyalkylénées sur des acides gras ou sur des mélanges d'acides gras d'origine végétale ou animale ou par transestérification de leurs esters méthyliques. Cette  
20 estérification est suivie d'une quaternisation à l'aide d'un agent alkylant tel qu'un halogénure d'alkyle (méthyle ou éthyle de préférence), un sulfate de dialkyle (méthyle ou éthyle de préférence), le méthanesulfonate de méthyle, le paratoluènesulfonate de méthyle, la chlorhydrine du glycol ou du glycérol.

25 De tels composés sont par exemple commercialisés sous les dénominations DEHYQUART par la société HENKEL, STEPANQUAT par la société STEPAN, NOXAMIUM par la société CECA, REWOQUAT WE 18 par la société REWO-WITCO.

Les lipides amphiphiles non-ioniques (A) formant la membrane des vésicules suivant  
30 l'invention sont de préférence choisis dans le groupe formé par :

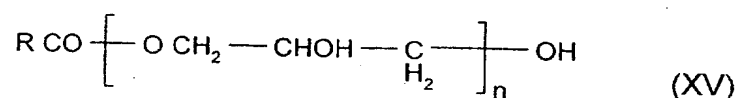
- les esters et/ou les éthers de polyol et d'acide gras, polyoxyéthylénés ou non ;
- les esters et/ou les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside ;
- les phospholipides synthétiques ou naturels, hydrogénés ou non.

35 Les esters ou les éthers de polyol et d'acide gras sont de préférence choisis parmi les mélanges d'esters ou les mélanges d'éthers d'au moins un polyol choisi dans le groupe

formé par le polyéthylèneglycol comportant de 1 à 60 unités oxyde d'éthylène, le sorbitane, le sorbitane portant 2 à 60 unités d'oxyde d'éthylène, le glycérol portant 2 à 30 unités d'oxyde d'éthylène, les polyglycérols comportant 2 à 15 unités glycérol, les sucroses, les glucoses portant 2 à 30 unités oxyde d'éthylène, et au moins un acide gras  
 5 comportant une chaîne alkyle en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub>, saturée ou non saturée, linéaire ou ramifiée, le nombre de chaînes alkyle par groupe polyol étant compris entre 1 et 10.

Les esters de polyol et d'acides gras en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub> particulièrement préférés sont ceux répondant à la formule (XV) suivante :

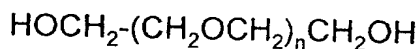
10



où n est une valeur statistique et qui peut contenir des proportions diverses d'esters pour lesquels n = 1, n = 2, n = 3, n = 4, etc ; c'est aussi le cas des esters comportant plusieurs  
 15 chaînes alkyle dans leur partie lipophile, tels que les cocoates, qui contiennent des chaînes alkyles en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub> ou les isostéarates où les chaînes alkyle sont en C<sub>17</sub> sont un mélange complexe de formes isomères ; c'est également le cas des produits constitués par des mélanges de mono-, di-, tri- ou polyesters d'un même polyol.

20 Parmi les produits commerciaux utilisables selon l'invention et ayant la structure d'un mélange d'esters de polyol et d'acide gras en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub> tel que défini ci-dessus, on peut citer:

- les esters partiels de sorbitane (ou anhydride de sorbitol) et d'acide gras, vendus sous les dénominations commerciales "SPAN 20, 40, 60 et 80" par la Société "ICI" ;
- 25 - l'isostéarate de sorbitane, vendu sous la dénomination commerciale "SI 10 R NIKKOL" par la Société "NIKKO" ;
- le stéarate de sorbitane portant 4 unités oxyde d'éthylène, vendu sous la dénomination "TWEEN 61" par la Société "ICI" ;
- le stéarate de polyéthylèneglycol à 8 unités oxyde d'éthylène vendu sous le nom  
 30 "MYR J 45" par "ICI" ;
- le monostéarate du polyéthylène glycol de formule (XVI) suivante:



(XVI)



dans laquelle n est égal à 4, vendu sous la dénomination "MYS 4" par la Société "NIKKO" ;

- le stéarate de polyéthylèneglycol de poids moléculaire 400, qualité chimique ou qualité produite par biotechnologie, vendu par la Société "UNICHEMA" ;
- 5 - le stéarate de diglycéryle portant 4 unités d'oxyde d'éthylène, vendu sous la dénomination "HOSTACERINE DGS" par la Société "HOESCHT" ;
- le stéarate de tétraglycérol, vendu sous la dénomination "TETRAGLYN 1S" par la Société "NIKKO" ;
- l'isostéarate de diglycéryle, vendu par la Société "SOLVAY" ;
- 10 - le distéarate de diglycéryle, vendu sous la dénomination "EMALEX DSG 2" par la Société "NIHON" ;
- les mono-, di- et tri-palmitostéarate de sucrose, vendu sous les dénominations "F50, F70, F110 et F160 CRODESTA" par la Société "CRODA" ;
- le mélange de mono- et di-palmitostéarate de sucrose, vendu sous la dénomination
- 15 "GRILLOTEN PSE 141 G" par la Société "GRILLO" ;
- le mélange de stéarate de sucrose et de cocoate de sucrose, vendu sous la dénomination "ARLATONE 2121" par la Société "ICI" ;
- le distéarate de méthylglucose portant 20 unités oxyde d'éthylène, vendu sous la dénomination "GLUCAM E20 DISTEARATE" par la Société "AMERCHOL".

20

Les esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside utilisés selon l'invention sont de préférence, soit des mélanges d'esters et/ou des mélanges d'éthers de différents acides gras d' $\alpha$ -butylglucoside dont les différentes chaînes grasses comportent, l'une par rapport à l'autre, un nombre d'atomes de carbone voisin (par exemple différent de 1 ou 2) soit

25 des mélanges de mono-, di- tri- ou polyesters et/ou des mélanges de mono-, di- tri-polyéthers d'un même acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside.

25

Les esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside utilisé(s) selon l'invention comporte(nt) de préférence une chaîne grasse ayant de 8 à 24 atomes de carbone, plus

30 préférentiellement de 12 à 22 atomes de carbone et plus particulièrement de 14 à 18 atomes de carbone.

30

On peut citer par exemple, les esters et les éthers d'acide laurique ( $C_{12}$ ), myristique ( $C_{14}$ ), palmitique ( $C_{16}$ ), stéarique ( $C_{18}$ ), béhénique ( $C_{22}$ ) d' $\alpha$ -butylglucoside.

35

On utilise plus particulièrement un mélange de mono- et de diester d'acide palmitique d' $\alpha$ -butylglucoside obtenu selon le procédé de fabrication enzymatique décrit dans les vésicules lipidiques conformes à l'invention.

- 5 Les esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside conformes à l'invention peuvent être préparés à partir d' $\alpha$ -butylglucoside obtenu selon le procédé de fabrication enzymatique décrit dans la demande de brevet FR-A-2680373 qui consiste à mettre en contact le butanol avec de l'amidon, des maltodextrines ou du maltose en présence d'une préparation enzymatique purifiée présentant une activité d' $\alpha$ -transglucosylation. Les
- 10 esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside peuvent être synthétisés en faisant réagir l'acide gras ou le mélange d'acide gras correspondants avec l' $\alpha$ -butylglucoside selon des procédés classiques.
- 15 Les phospholipides synthétiques ou naturels, hydrogénés ou non préférés suivant l'invention sont choisis parmi la lécithine, de préférence hydrogénée, associé soit à du cholestérol et éventuellement à un tensioactif ionique, et un phytostérol oxyéthyléné comprenant de 2 à 50 motifs oxyde d'éthylène
- 20 A cette liste, il convient également d'ajouter les lipides amphiphiles décrits dans les documents FR 2 315 991 et FR 2 485 921 qui sont incorporés ici par référence.
- 25 De façon connue, on peut utiliser pour la fabrication des dispersions vésiculaires suivant l'invention des mélanges de lipides amphiphiles ioniques, des mélanges de lipides amphiphiles non ioniques et des mélanges de ces deux types de lipides.
- Selon un mode préférentiel de l'invention, le rapport en poids entre la quantité de lipide amphiphile non-ionique (A) et de lipide amphiphile ionique (B) est compris entre 50/1 et 50/25.
- 30 On peut, de façon connue, incorporer dans la phase lipidique constituant la membrane lipidique des vésicules à cœur aqueux de l'invention, au moins un additif qui a pour fonction principale de diminuer la perméabilité des vésicules, de prévenir leur floculation et leur fusion et d'augmenter le taux d'encapsulation.
- 35 Selon un mode préférentiel de l'invention, on peut ajouter à la phase lipidique au moins un additif choisi, de préférence, dans le groupe formé par :

On utilise plus particulièrement un mélange de mono- et de diester d'acide palmitique d' $\alpha$ -butylglucoside obtenu selon le procédé de fabrication enzymatique décrit dans les vésicules lipidiques conformes à l'invention.

- 5 Les esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside conformes à l'invention peuvent être préparés à partir d' $\alpha$ -butylglucoside obtenu selon le procédé de fabrication enzymatique décrit dans la demande de brevet FR-A-2680373 qui consiste à mettre en contact le butanol avec de l'amidon, des maltodextrines ou du maltose en présence d'une préparation enzymatique purifiée présentant une activité d' $\alpha$ -transglucosylation. Les
- 10 esters et les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside peuvent être synthétisés en faisant réagir l'acide gras ou le mélange d'acide gras correspondants avec l' $\alpha$ -butylglucoside selon des procédés classiques.

- 15 Les phospholipides synthétiques ou naturels, hydrogénés ou non préférés suivant l'invention sont choisis parmi la lécithine, de préférence hydrogénée, associé soit à du cholestérol et éventuellement à un tensioactif ionique, et un phytostérol oxyéthyléné comprenant de 2 à 50 motifs oxyde d'éthylène

- 20 A cette liste, il convient également d'ajouter les lipides amphiphiles décrits dans les documents FR 2 315 991 et FR 2 485 921.

De façon connue, on peut utiliser pour la fabrication des dispersions vésiculaires suivant l'invention des mélanges de lipides amphiphiles ioniques, des mélanges de lipides amphiphiles non ioniques et des mélanges de ces deux types de lipides.

- 25 Selon un mode préférentiel de l'invention, le rapport en poids entre la quantité de lipide amphiphile non-ionique (A) et de lipide amphiphile ionique (B) est compris entre 50/1 et 50/25.

- 30 On peut, de façon connue, incorporer dans la phase lipidique constituant la membrane lipidique des vésicules à cœur aqueux de l'invention, au moins un additif qui a pour fonction principale de diminuer la perméabilité des vésicules, de prévenir leur floculation et leur fusion et d'augmenter le taux d'encapsulation.

- 35 Selon un mode préférentiel de l'invention, on peut ajouter à la phase lipidique au moins un additif choisi, de préférence, dans le groupe formé par :

- les stérols et notamment les phytostérols et le cholestérol,
- les alcools et diols à longue chaîne,
- les amines à longue chaîne et leurs dérivés ammonium quaternaire.

Ces additifs peuvent éventuellement avoir une activité cosmétique et/ou  
5 dermatopharmaceutique. C'est, par exemple, le cas du cholestérol.

Leur taux va de 0 à 50% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant  
les vésicules à cœur aqueux.

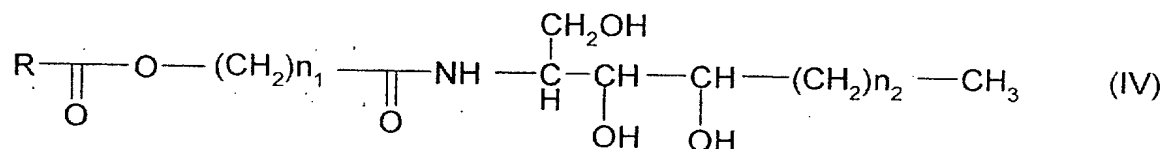
10 Dans la composition selon l'invention, les vésicules à cœur aqueux ont de préférence un  
diamètre moyen allant de 10 à 5 000 nm.

Avantageusement, la dispersion vésiculaire suivant l'invention peut également contenir  
au moins un autre céramide choisi parmi les céramides STAR, 1, 2, 2.5, 3, 4 5 et/ou 6  
(tels que décrits dans le document "The Normal Human stratum corneum: a new  
15 ceramide profile" M. Chopart *et al.* Prospectives in Percutaneous Penetration, 8th  
Internationak Conference Antibes Juan-Les Pins, France April 2-6, 2002),  
avantageusement les céramides STAR et/ou 4.

Le taux de céramide additionnel va de 0.001% à 30%, préférentiellement 0.001 à 10% et  
plus particulièrement 0.001% à 5% par rapport au poids total de la composition lipidique  
20 constituant les vésicules.

Par céramide 2.5 on entend un composé dont la constitution peut être représentée par la  
formule (IV) suivante :

25



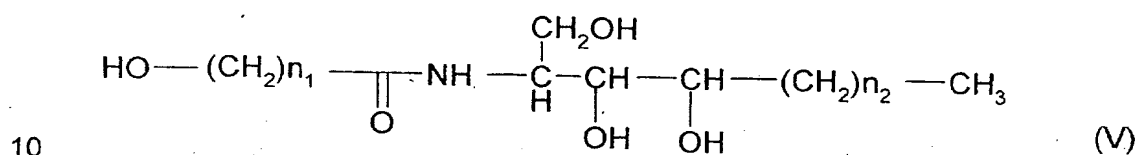
dans laquelle  $n_1$  est compris entre 22 et 35, de préférence entre 25 et 33, de préférence  
encore entre 26 et 29 et  $n_2$  est compris entre 11 et 21, de préférence entre 13 et 17, de  
30 préférence encore entre 13 et 15, et RCO désigne un résidu linoléoyle. La valeur de  $n_1$   
est de préférence égale à 29.

Les composés de formule (IV) peuvent être isolés à partir de prélèvements lipidiques  
réalisés par des méthodes non invasives sur des volontaires sains. Ces prélèvements

lipidiques sont ensuite soumis à un traitement préparatif et analytique permettant de séparer et d'identifier les familles céramidiques.

- 5 Une autre source potentielle des composés de formule (IV) réside dans l'utilisation d'enzymes telles que des trans-acylases agissant sur des précurseurs ou des modulateurs de ces enzymes.

Les précurseurs sont notamment des composés de formule (V) suivante:

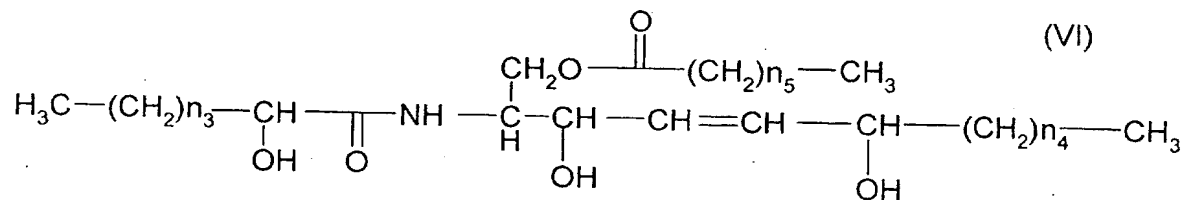


dans laquelle  $n_1$  est compris entre 22 et 35, de préférence entre 25 et 33, de préférence encore entre 26 et 29 et  $n_2$  est compris entre 11 et 21, de préférence entre 13 et 17, de préférence encore entre 13 et 15.

- 15 La valeur de  $n_1$  est de préférence égale à 29.

Ces précurseurs correspondent aux composés de formule (IV) non estérifiés sur l'OH terminal de l'acide gras hydroxylé.

- 20 Par céramide STAR on entend un composé dont la constitution peut être représentée par la formule (VI) suivante :



- 25 dans laquelle  $n_3$  est compris entre 17 et 35, de préférence entre 21 et 30, préférentiellement entre 23 et 28, de préférence encore est égal à 25, 26 ou 27,  $n_4$  est compris entre 9 et 18, de préférence entre 11 et 15, préférentiellement entre 11 et 13, de préférence encore égal à 11, et  $n_5$  est compris entre 12 et 18, de préférence entre 14 et 16, de préférence égal à 14.

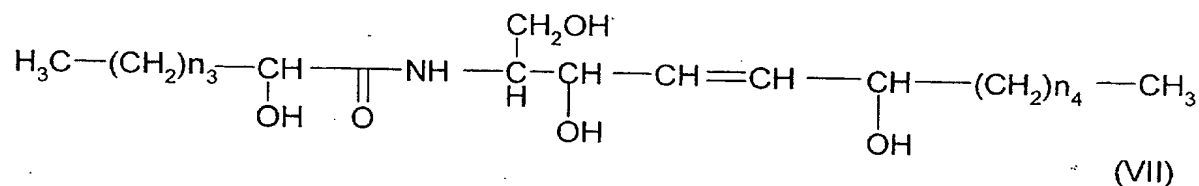


Les composés de formule (VI) peuvent être isolés à partir de prélèvements lipidiques réalisés par des méthodes non invasives sur des volontaires sains. Ces prélèvements lipidiques sont ensuite soumis à un traitement préparatif et analytique permettant de séparer et d'identifier les familles céramidiques.

5

Une autre source potentielle des composés formule (VI) réside dans l'utilisation d'enzymes telles que des trans-acylases agissant sur des précurseurs ou des modulateurs de ces enzymes.

10 Les précurseurs sont notamment des composés de formule (VII) suivante :



15 dans laquelle  $n_3$  est compris entre 17 et 35, de préférence entre 21 et 30, préférentiellement entre 23 et 28, de préférence encore entre 25 et 27,  $n_4$  est compris entre 9 et 18, de préférence entre 11 et 15, , préférentiellement entre 11 et 13, de préférence encore égale à 11.

Ces précurseurs correspondent aux composés de formule (VI) non estérifiés en position 1.

20 Avantageusement, la dispersion vésiculaire suivant l'invention peut également contenir au moins un actif additionnel.

Si les actifs sont hydrosolubles, on les introduit dans la phase hydrophile encapsulée des vésicules.

25 Si les actifs sont liposolubles, on les introduit dans la phase lipidique constituant la membrane.

Si les actifs sont amphiphiles, ils se répartissent entre la phase lipidique et la phase hydrophile encapsulée avec un coefficient de partage, qui varie selon la nature de l'actif amphiphile et les compositions respectives de la phase lipidique et de la phase hydrophile encapsulée.

30

Avantageusement, la dispersion vésiculaire suivant l'invention peut également contenir au moins un autre composé permettant d'améliorer la fonction barrière. Ce dérivé est choisi parmi l'acide ascorbique (vitamine C) ou ses analogues, les lécithines, les

glycosphingolipides, les phospholipides, le cholestérol et ses dérivés, les phytostérols (stigmasterol,  $\beta$ -sitostérol, campestérol), les acides gras essentiels, le 1-2 diacylglycérol, la 4-chromanone, les triterpènes pentacycliques tels que l'acide ursolique, la vaseline et la lanoline.

- 5 De préférence, le composé permettant d'améliorer la fonction barrière est l'acide ascorbique peut être sous forme D ou L, avantageusement sous forme L ou ses analogues choisis parmi ses sels, de préférence l'ascorbate de sodium, l'ascorbylphosphate de magnésium ou de sodium, ses esters, de préférence ses esters acétique, propionique ou palmitique, ou ses sucres, de préférence l'acide ascorbique
- 10 glycosylé.

L'invention est illustrée plus en détail dans les exemples suivants. Ces exemples ne sauraient limiter en aucune façon la portée de l'invention.

**EXEMPLE 1 : Préparation du céramide 7 de formule (I) par CCM à partir de stratum corneum humain**

15

**Etape 1: Extraction par turbine**

Echantillon de départ : Epiderme d'un volontaire sain

Action : passage de solvants organiques (le plus souvent un mélange d'hexane/éthanol

- 20 2/3) au travers du stratum corneum pour entraîner les lipides grâce à une turbine.

Echantillon final : Lipides épidermiques sous forme solvatée

**Etape 1 bis: Extraction à partir de stripping vernis**

Echantillon de départ : Epiderme d'un volontaire sain

- 25 Action : application d'une bande adhésive -verniss+nylon- sur la peau de volontaires, puis arrachage de l'ensemble entraînant par la même une partie du stratum. Les strips sont ensuite mis en présence de solvants (de type Chloroforme Méthanol (2/1) sous agitation.

Echantillon final : Lipides épidermiques sous forme solvatée

**30 Etape 2: Isolement des céramides 7**

Echantillon départ : Lipides épidermiques sous forme solvatée (lipides totaux)

Action : Séparation des familles céramidiques

- Après concentration si nécessaire du pool lipidique ainsi obtenu (la concentration étant obtenue par évaporation d'une partie des solvants) , le pool de lipides est
- 35 déposé sur une plaque de silice Whatman LK5 de 20x20 cm ou 5721 Merk et on procède à 2 éluions successives avec un mélange chloroforme /méthanol /acide

acétique dans les rapports 190/5/1 pour la première élution et 190/9/1 pour la seconde élution.

- Les classes de céramides sont repérées en ultraviolet (à 254 nm) après vaporisation sur la plaque d'une solution de primuline à 5 mg/100 ml (révélation de la laque). Cette observation permet de délimiter une dizaine de zones contiguës sur la plaque de silice numérotées par exemple de 1 à 10 en allant de la zone la plus éluée à la zone la moins éluée. La silice de chacune de ces zones est grattée, récupérée et extraite (pour en extraire les céramides) à plusieurs reprises avec un mélange de chloroforme /méthanol (2/1). Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau puis évaporées à sec pour obtenir les composés céramidiques purs. Ces céramides (regroupés donc par bandes de migration) sont alors remis en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1). Une faible proportion de chaque échantillon est prélevée pour identification analytique (voir analyse structurale des composés céramidiques paragraphe suivant) du contenu en céramides afin de déterminer la classe du céramide majoritaire et quelles sont les impuretés (autres céramides généralement). Il est ainsi possible d'identifier l'échantillon contenant le céramide 7, généralement mélangé avec du céramide 6 (impureté)

Echantillon final : Céramide 7 (+ Céramide 6 sous forme d'impuretés) solvaté

### 20 **Etape 3: Purification de l'échantillon de céramide 7 si nécessaire**

Echantillon départ : Céramide 7 (+ Céramide 6 sous forme d'impuretés) solvaté

Action : L'échantillon contenant le céramide 7 est alors purifié en répétant l'étape 2: dépôt de l'échantillon, révélation, grattage de la silice et extraction des céramides, identification de la bande comprenant principalement le céramide 7 (analyse structurale finale).

Echantillon final : Céramide 7 de formule (I) purifié

### Analyse structurale des composés céramidiques :

30 L'échantillon destiné à l'analyse est réparti en deux fractions.

On réalise une dérivation de la première fraction céramides au moyen du chlorure de benzoyle. Les dérivés benzoylés ainsi obtenus sont séparés en chromatographie liquide haute performance et injectés dans un spectrographe de masse en sortie de colonne par couplage HPLC-MS.

La deuxième fraction subit une hydrolyse alcaline pour libérer les bases sphingoides

contenues dans les céramides. Les bases libérées sont dérivées à l'orthophtalaldéhyde avant d'être séparées en HPLC avec détection en fluorescence.

L'ensemble des résultats analytiques ainsi obtenu permet d'attribuer une structure moléculaire précise à chaque céramide présent dans l'échantillon.

5

### **EXEMPLE 2: Préparation du céramide 5.5 par CCM à partir de stratum corneum humain**

La préparation du céramide 5.5 est identique à celle du céramide 7 de l'exemple 1 à la différence que la bande isolée après analyse structurale du contenu en céramides des différentes bandes de migration sera la bande contenant principalement du céramide 5.5, et à la différence que ce dernier est généralement associé à une plus grande quantité d'impuretés (céramides 5) et que son obtention sous une forme correctement purifiée nécessite éventuellement de renouveler une fois ou plus si nécessaire l'étape 3 de purification.

15

### **EXEMPLE 3 Evaluation de l'efficacité des dispersions vésiculaires suivant l'invention sur la fonction barrière des peaux reconstruites**

20 On prépare les deux suspensions suivantes:

#### **Formule aux Niosomes sans céramide 7**

	Palmitate de sorbitan ( Span 40 commercialisé par Uniqema)	0.225%
	Cholestérol	0.225%
25	N Stéaroyl L Glutamique acide disodique	0.050%
	Propylène glycol	3.000%
	Eau	qsp 100.000%

#### **Formule aux niosomes contenant du céramide 7**

30	Palmitate de sorbitane	0.2250%
	Cholesterol	0.1250%
	N stearoyl l glutamic acid disodium	0.0500%
	Céramide 7	0.0315%
	Eau distillée	qsp 100.0000%

35

### Mode opératoire

- Dans les 2 cas, les lipides sont associés préalablement en phase solvant méthanol/chloroforme (50/50 en poids). Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film lipidique formé sur la paroi du ballon est
- 5 alors solubilisé par une solution aqueuse d'octylglucoside (6% ) pour former des micelles mixtes Octylglucoside/Lipides vésiculaires. Cette solution est ensuite dialysée pendant 24h contre de l'eau distillée. Les liposomes se forment au fur et à mesure que l'octylglucoside est dialysé.
- 10 Une étude est alors réalisée sur trois kits de douze puits contenant 1 cm<sup>2</sup> d'épiderme EPISKIN<sup>TM</sup> chacun.
- Les différents traitements sont :
- un kit témoin c'est à dire non traité
  - un kit placebo c'est à dire traité par une formule aux niosomes sans céramide 7
  - 15 - un kit traité par le céramide 7 formulé au sein d'une formule aux niosomes (formule CER 7)
- Les trois kits sont traités en topique : pour chaque type de traitement (à l'exception du kit témoin), deux microlitres de formule sont appliqués à la surface de chaque épiderme
- 20 reconstruit. Le traitement est renouvelé deux fois à 48 H d'intervalle. Les épidermes sont ensuite prélevés, les surfaces lavées, et les lipides contenus dans chaque épiderme extraits. Les sphingolipides (céramides essentiellement) sont enfin quantifiés par analyse de leur base sphingoïde.
- 25 Dans les conditions de traitements présentées ci dessus, les résultats montrent une augmentation sensible des bases 6-hydroxy-sphingénines retrouvées dans l'épiderme des modèles de peaux reconstruites EPISKIN<sup>TM</sup> traité par la formule aux liposomes contenant du céramide 7 par rapport à un épiderme non traité ou traité par le placebo comme le montre l'histogramme de la Figure 2.
- 30 La formulation du céramide 7 au sein d'une dispersion vésiculaire le stabilisant et le rendant biodisponible permet d'améliorer le profil céramidique des épidermes reconstruits du modèle EPISKIN<sup>TM</sup>. Or, l'augmentation de la proportion de céramides à base 6-hydroxy-sphingénine grâce à l'augmentation de la proportion de céramide 7 dans le profil des modèles de peau reconstruite comme EPISKIN<sup>TM</sup> permettent une augmentation de la
- 35 fonction barrière du modèle.

Ce procédé permet donc, en rendant la fonction barrière des modèles de peau reconstruite plus proche de la fonction barrière de la peau humaine normale, d'améliorer celle-ci.

5 **EXEMPLE 4 : Effet du céramide 7 formulé dans un niosome suivant l'invention sur la fonction barrière d'épidermes reconstruits EPISKIN™**

Principe de la méthode d'une étude de pénétration: Evaluer l'état de la fonction barrière des épidermes reconstruits du modèle EPISKIN™ traités avec le céramide 7 dans une  
10 formule niosomes par voie topique, par une étude de pénétration de la caféine radio marquée sur cellules de diffusion en mode statique : la caféine radiomarquée, molécule amphiphile, pénètre plus ou moins à travers l'épiderme selon la qualité de celui ci; plus la molécule passe à travers, plus la fonction barrière est altérée.

15 Les traitements des épidermes reconstruits du modèle EPISKIN™ sont effectués entre le 8° et le 14° jour de culture par application à la surface des épidermes de 2 µl soit de la formule niosomes contenant le céramide 7, soit de la formule sans céramide 7 (appelé formule placebo ) comme proposées dans l'exemple 3.

20 Au 14 ° jour de culture et après stabilisation des modèles dans les cellules de diffusion, 90µL (322µL/cm<sup>2</sup>) de solution de caféine C<sup>14</sup> en excès (10mM en glycérol, 135µCi/mMol) sont appliqués en surface des épidermes. Après 16h00 de pénétration, l'excès est prélevé et récupéré. La peau est récupérée à son tour, les tissus digérés. La radioactivité du milieu, puis de la peau, puis de l'excès sont alors comptabilisés au compteur à  
25 scintillation.

Les quantités totales de radioactivité ainsi récupérées sont ensuite ramenées à une même valeur expérimentale de dépôt afin de normaliser ces derniers et ainsi pouvoir mieux comparer l'effet des différents traitements. De plus, Pour avoir un résultat le plus  
30 représentatif possible de l'étude, les valeurs suivantes ont été couplées : Excès de surface + lavages (car les lavages constituent tout ce qui se trouve au dessus de l'épiderme) d'une part et Milieu récepteur + tissu (car tout ce qui pourrait être retrouvé dans le tissu a donc pénétré à travers) .

35 Les résultats de cette étude sont présentés sur l'histogramme de la figure 3.

L'histogramme de la figure 3 montre une fonction barrière améliorée pour les peaux reconstruites du modèle EPISKIN™ après traitement par du céramide 7 formulé dans des

niosômes puisque moins de caféine a pénétré dans les tissus et plus est restée en surface.

### **EXEMPLE 5: Préparation du céramide STAR**

5

#### **Prélèvement lipidique :**

Les prélèvements ont lieu sur une cohorte de 22 femmes (volontaires sains) d'âge moyen 33,8 ans +/- 8,8 et présentant une peau qualifiée de normale par les cliniciens. Les  
10 prélèvements sont réalisés sur l'avant bras à l'aide d'une turbine après nettoyage de la peau au moyen d'un coton imbibé d'éther afin d'éliminer les traces de sébum. La chambre d'extraction de la turbine, remplie avec 10 ml de mélange hexane/éthanol (2/3) est appliquée sur une surface de 12,56 cm<sup>2</sup>. Le mélange est agité durant 1 minute puis est collecté à l'aide d'une seringue en verre puis stocké dans un récipient en verre à -20  
15 °C.

Trois prélèvements sont ainsi réalisés sur l'avant bras de chaque personne. Les échantillons sont ensuite rassemblés, évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, repris dans 1 ml de chloroforme /méthanol (2/1) et conservé à -20 °C. L'extrait sec correspondant à l'ensemble de ces prélèvements est de 36,4 mg et représente une  
20 surface extraite de 829 cm<sup>2</sup>.

#### **Séparation et isolement des céramides :**

Dans un premier temps, on sépare les céramides des autres catégories de lipides en déposant l'échantillon lipidique précédemment obtenu sur une cartouche de silice phase  
25 normale (gel de silice 60). Après élimination des lipides neutres par 10 ml de chloroforme contenant 1% d'acide acétique, les céramides sont élués avec 10 ml de mélange chloroforme /méthanol (95/5). Les céramides sont ensuite stockés dans 1 ml de chloroforme à -20 °C.

30

Dans un second temps, les différents céramides sont séparées par chromatographie couche mince dans les conditions suivantes :

On dépose 1,7 mg du mélange de céramides obtenus à l'issue de la première étape sur une plaque de silice Whatman LK5 de 20x20 cm et on procède à 2 éluions successives  
35 avec un mélange chloroforme /méthanol /acide acétique dans les rapports 190/5/1 pour la première élution et 190/9/1 pour la seconde élution.

Les classes de céramides sont repérées en ultraviolet (à 254 nm) après vaporisation sur la plaque d'une solution de primuline à 5 mg/100 ml. Cette observation permet de délimiter 10 zones contiguës sur la plaque de silice numérotées de 1 à 10 en allant de la zone la plus éluée à la zone la moins éluée. La silice de chacune de ces zones est grattée, récupérée et extraite à plusieurs reprises avec un mélange de chloroforme/méthanol (2/1). Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau puis évaporées à sec pour obtenir les composés céramidiques purs. Une partie de ces céramides est ensuite remise en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1) pour identification analytique.

5

On récupère dans la tache no1 de la plaque de silice, les céramides décrits précédemment tels que  $n_3$  est compris entre 17 et 35,  $n_4$  est compris entre 9 et 18, et  $n_5$  est compris entre 12 et 18.

10

#### Analyse structurale des composés céramidiques :

L'échantillon destiné à l'analyse est réparti en deux fractions.

On réalise une dérivation de la première fraction céramides au moyen du chlorure de benzoyle. Les dérivés benzoylés ainsi obtenus sont séparés en chromatographie liquide haute performance et injectés dans un spectrographe de masse en sortie de colonne par couplage HPLC-MS.

La deuxième fraction subit une hydrolyse alcaline pour libérer les bases sphingoïdes contenues dans les céramides. Les bases libérées sont dérivées à l'orthophtalaldéhyde avant d'être séparées en HPLC avec détection en fluorescence.

20

L'ensemble des résultats analytiques ainsi obtenu permet d'attribuer une structure moléculaire précise à chaque céramide présent dans l'échantillon.

Dans le mélange, on isole une fraction A contenant les céramides tels que  $n_3$  est compris entre 25 et 27,  $n_4$  est égal à 11, et  $n_5$  est égal à 14.

25

#### EXEMPLE 6 : Préparation du céramide 2.5

La préparation du céramide 2.5 est identique à celle du céramide STAR de l'exemple 5 à la différence de l'étape de séparation et d'isolement des céramides à l'issue de laquelle on récupère dans la tache no4 de la plaque de silice, les céramides décrits précédemment

30

35



tels que  $n_1$  est compris entre 22 et 35 et  $n_2$  est compris entre 11 et 21 et RCO désigne un résidu linoléoylé. En outre, au cours de l'analyse structurale des composés céramidiques on isole dans le mélange, une fraction A contenant les céramides telles que  $n_1$  est égal à 29, et  $n_2$  est compris entre 13 et 15.

5

**EXEMPLE 7 : Milieu de culture sur lequel on peut additionner un dérivé de la famille du céramide 7 en association avec le BSA**

10	- Milieux de cultures DMEM (3 volumes) et HAM F12 (1 volume) commercialisés par DUBELCCO et GIBCO	450 ml
	- Sérum de veau supplémenté en fer	50 ml
	- EGF (facteur de croissance épidermique). (10 ng / ml)	500 $\mu$ l
	- Isoprotérénol ( $10^{-6}$ M)	500 $\mu$ L
	- Hydrocortisone (0,4 $\mu$ g/ml)	400 $\mu$ l
15	- L-Glutamine (2mM)	5 ml
	- D.L $\alpha$ Tocophérol acétate	10.6 $\mu$ moles
	- L Carnitine	5.1 $\mu$ moles
	- BSA (Bovine Serum Albumine)	12.1 $\mu$ moles
	- Céramide 7	175 $\mu$ g
20		(0.25 $\mu$ moles)

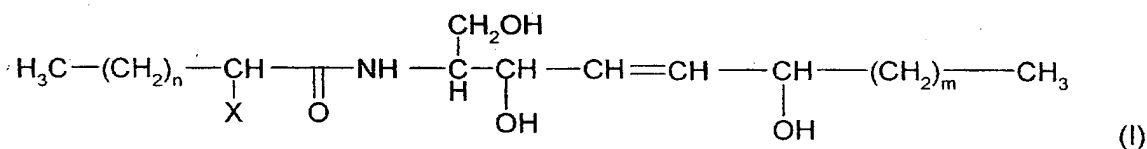
**EXEMPLE 8 : Formule aux Liposomes contenant le céramide 7**

25	- Lécithine de soja (enrichie à 75% de phosphatidylcholine) vendue par SEPPIC sous la dénomination commerciale Lipoïd S75	0.5000%
	- Propylène glycol	3.0000%
	- Céramide 7	0.0315%
	- Eau	qsp 100.0000%

30

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau  
 5 supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I), consistant à introduire au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 dans le milieu de culture dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau et/ou à appliquer topiquement sur la surface dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de  
 10 la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) suivante:



dans laquelle :

- 15 - X représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle (OH);  
 avantageusement un groupement hydroxyle ;  
 - n est compris entre 19 et 29 carbones, de préférence entre 21 et 27 carbones,  
 avantageusement égal à 21, 22 ou 23 carbones ;  
 - m est compris entre 9 et 19 carbones, de préférence entre 9 et 15 carbones,  
 20 avantageusement égal à 11, 12 ou 13 carbones.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que n est compris entre 21 et 27;  
 m est compris entre 9 et 15.

- 25 3. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que n est égal à 21, 22 ou 23; m est égal à 11, 12 ou 13.

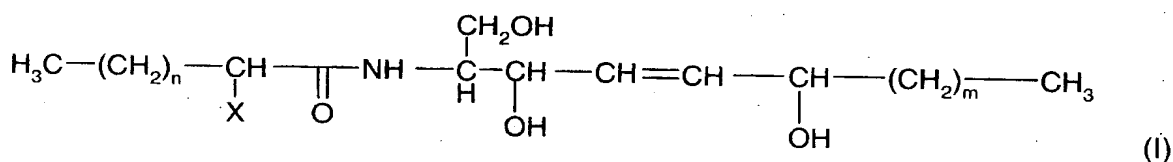
4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que n est égal à 21 et m est égal à 11.

30

5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que X représente un groupement hydroxyle.

## REVENDECATIONS

1. Procédé de préparation d'un épiderme reconstruit ou d'un équivalent de peau  
5 supplémenté en au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I), consistant à introduire au moins un dérivé du céramide 7 et/ou 5.5 dans le milieu de culture dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau et/ou à appliquer topiquement sur la surface dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de  
10 la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I) suivante:



dans laquelle :

- 15 - X représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle (OH);  
avantageusement un groupement hydroxyle ;  
- n est compris entre 19 et 29 carbones, de préférence entre 21 et 27 carbones,  
avantageusement égal à 21, 22 ou 23 carbones ;  
- m est compris entre 9 et 19 carbones, de préférence entre 9 et 15 carbones,  
20 avantageusement égal à 11, 12 ou 13 carbones.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que n est compris entre 21 et 27;  
m est compris entre 9 et 15.

25 3. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que n est égal à 21, 22 ou 23; m est égal à 11, 12 ou 13.

4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que n est égal à 21 et m est égal à 11.

30 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que X représente un groupement hydroxyle.

6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'introduction dans le milieu de culture d'au moins un dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I) est réalisée après dissolution préalable dudit dérivé ou de la dite composition dans un solvant.

5

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le solvant est l'éthanol ou le DMSO étant entendu que le rapport final en solvant introduit dans le milieu de culture ne doit pas dépasser 1/1000.

10

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on introduit dans le milieu de culture une association contenant au moins un dit dérivé de formule (I) et au moins une molécule capable de véhiculer et de rendre biodisponible le dit dérivé au sein de l'épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau à partir du milieu de culture.

15

9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que dans l'association la dite molécule est choisie parmi le BSA et/ou un composé de la famille des cyclodextrines, étant entendu que la concentration de BSA pouvant être introduite dans le milieu de culture doit être inférieure ou égale à 100  $\mu\text{mol/l}$ .

20

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que l'association comprend en outre au moins un agent antioxydant et un transporteur cellulaire, étant entendu que la concentration en agent antioxydant et en transporteur cellulaire pouvant être introduit dans le milieu de culture doit être inférieure ou égale à 50  $\mu\text{mol/l}$  et 100  $\mu\text{mol/l}$  respectivement de milieu de culture.

25

11. Procédé suivant la revendication précédente, caractérisé en ce que l'agent antioxydant est le D.L  $\alpha$  Tocophérol acétate le transporteur cellulaire est la L Carnitine.

30

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on introduit dans le milieu de culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I).

35

13. Procédé suivant la revendication précédente, caractérisé en ce que la composition correspond à l'une des compositions définies dans les revendications 15 à 36.

6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'introduction dans le milieu de culture d'au moins un dérivé de céramide 5.5 et/ou 7 de formule (I) est réalisée après dissolution préalable dudit dérivé ou de la dite composition dans un solvant.

5

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le solvant est l'éthanol ou le DMSO étant entendu que le rapport final en solvant introduit dans le milieu de culture ne doit pas dépasser 1/1000.

10

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on introduit dans le milieu de culture une association contenant au moins un dit dérivé de formule (I) et au moins une molécule capable de véhiculer et de rendre biodisponible le dit dérivé au sein de l'épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau à partir du milieu de culture.

15

9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que dans l'association la dite molécule est choisie parmi le BSA et/ou un composé de la famille des cyclodextrines, étant entendu que la concentration de BSA pouvant être introduite dans le milieu de culture doit être inférieure ou égale à 100  $\mu\text{mol/l}$ .

20

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que l'association comprend en outre au moins un agent antioxydant et un transporteur cellulaire, étant entendu que la concentration en agent antioxydant et en transporteur cellulaire pouvant être introduit dans le milieu de culture doit être inférieure ou égale à 50  $\mu\text{mol/l}$  et 100  $\mu\text{mol/l}$  respectivement de milieu de culture.

25

11. Procédé suivant la revendication précédente, caractérisé en ce que l'agent antioxydant est le D.L  $\alpha$  Tocophérol acétate le transporteur cellulaire est la L Carnitine.

30

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on introduit dans le milieu de culture une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I).

14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration d'au moins un dérivé de formule (I) introduit dans le milieu de culture est comprise entre 10 g/l et  $10^6$  g/l.
- 5
15. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'application topique sur la surface dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture est réalisée avec une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I).
- 10
16. Procédé suivant la revendication précédente, caractérisée en ce que la composition qui comprend une dispersion, dans une phase aqueuse externe, de vésicules formées par des phases lamellaires lipidiques séparées les unes des autres par des couches hydrophiles, lesdites phases lamellaires comprenant au moins un lipide amphiphile, et au
- 15
- moins ledit dérivé de formule (I) inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques.
17. Procédé suivant la revendication selon l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisée en ce que les vésicules sont des niosomes ou des liposomes.
- 20
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que le taux de dérivé de formule (I) représente de 0.001% à 30% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant les vésicules.
- 25
19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que le taux de dérivé de formule (I) représente de 0.001% à 10%, de préférence 0.001% à 5% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant les vésicules.
- 30
20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisée en ce que le rapport en poids entre la quantité de phase lipidique et la quantité de phase aqueuse de la dispersion étant compris entre 1/1000 et 300/1000.
21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, caractérisée en ce que les phases lamellaires comprennent au moins un lipide amphiphile non ionique, choisi parmi :
- 35
- les esters et/ou les éthers de polyol et d'acide gras, polyoxyéthylénés ou non ;
  - les esters et/ou les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside;

13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration d'au moins un dérivé de formule (I) introduit dans le milieu de culture est comprise entre 10 g/l et  $10^{-6}$  g/l.
- 5 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'application topique sur la surface dudit épiderme reconstruit ou dudit équivalent de peau en culture est réalisée avec une composition à base de vésicules lamellaires lipidiques incorporant au moins un dérivé de la famille du céramide 7 et/ou 5.5 de formule (I).
- 10 15. Procédé suivant la revendication précédente, caractérisée en ce que la composition qui comprend une dispersion, dans une phase aqueuse externe, de vésicules formées par des phases lamellaires lipidiques séparées les unes des autres par des couches hydrophiles, lesdites phases lamellaires comprenant au moins un lipide amphiphile, et au moins ledit dérivé de formule (I) inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques.
- 15 16. Procédé suivant la revendication selon l'une quelconque des revendications 14 à 15, caractérisée en ce que les vésicules sont des niosomes ou des liposomes.
- 20 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que le taux de dérivé de formule (I) représente de 0.001% à 30% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant les vésicules.
- 25 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisée en ce que le taux de dérivé de formule (I) représente de 0.001% à 10%, de préférence 0.001% à 5% par rapport au poids total de la composition lipidique constituant les vésicules.
- 30 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que le rapport en poids entre la quantité de phase lipidique et la quantité de phase aqueuse de la dispersion étant compris entre 1/1000 et 300/1000.
- 35 20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisée en ce que les phases lamellaires comprennent au moins un lipide amphiphile non ionique, choisi parmi :
- les esters et/ou les éthers de polyol et d'acide gras, polyoxyéthylénés ou non ;
  - les esters et/ou les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside;
  - les phospholipides synthétiques ou naturels, hydrogénés ou non.

- les phospholipides synthétiques ou naturels, hydrogénés ou non.

22. Procédé suivant la revendication 21, caractérisée en ce que les esters ou les éthers de polyol et d'acide gras sont choisis parmi les mélanges d'esters ou les mélanges d'éthers d'au moins un polyol choisi dans le groupe formé par le polyéthylèneglycol comportant de 1 à 60 unités oxyde d'éthylène, le sorbitane, le sorbitane portant 2 à 60 unités d'oxyde d'éthylène, le glycérol portant 2 à 30 unités d'oxyde d'éthylène, les polyglycérols comportant 2 à 15 unités glycérol, les sucres, les glucoses portant 2 à 30 unités oxyde d'éthylène, et au moins un acide gras comportant une chaîne alkyle en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub>, saturée ou non saturée, linéaire ou ramifiée, le nombre de chaînes alkyle par groupe polyol étant compris entre 1 et 10.

23. Procédé suivant la revendication 21, caractérisée en ce que les esters et/ou les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside sont choisis parmi :

- des mélanges d'esters et/ou des mélanges d'éthers de différents acides gras d' $\alpha$ -butylglycoside dont les différentes chaînes grasses comportent, l'une par rapport à l'autre, un nombre d'atomes de carbone voisin (par exemple différent de 1 ou 2) ou,
  - des mélanges de mono-, di- tri- ou polyesters et/ou des mélanges de mono-, di- tri-polyéthers d'un même acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside;
- les dits esters et lesdits éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside utilisé(s) comporte(nt) une chaîne grasse ayant de 8 à 24 atomes de carbone.

24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisée en ce que les phases lamellaires comprennent en outre au moins un lipide amphiphile ionique.

25. Procédé suivant selon la revendication 24, caractérisée en ce que le lipide amphiphile ionique est choisi dans le groupe formé par :

- les sels alcalins du dicétyl- et du dimyristylphosphate ;
- les sels alcalins du cholestérol sulfate ;
- les sels alcalins du cholestérol phosphate ;
- les lipoaminoacides et leurs sels tels que les acylglutamates mono- et di-sodiques comme le sel disodique de l'acide N-stéaroyl L-glutamique commercialisé sous la dénomination Acylglutamate HS21 par la société AJINOMOTO ;
- les sels de sodium de l'acide phosphatidique ;
- les phospholipides ;
- les dérivés alkylsulfoniques notamment de formule (X) :



21. Procédé suivant la revendication 20, caractérisée en ce que les esters ou les éthers de polyol et d'acide gras sont choisis parmi les mélanges d'esters ou les mélanges d'éthers d'au moins un polyol choisi dans le groupe formé par le polyéthylèneglycol comportant de 1 à 60 unités oxyde d'éthylène, le sorbitane, le sorbitane portant 2 à 60 unités d'oxyde d'éthylène, le glycérol portant 2 à 30 unités d'oxyde d'éthylène, les polyglycérols comportant 2 à 15 unités glycérol, les sucroses, les glucoses portant 2 à 30 unités oxyde d'éthylène, et au moins un acide gras comportant une chaîne alkyle en C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub>, saturée ou non saturée, linéaire ou ramifiée, le nombre de chaînes alkyle par groupe polyol étant compris entre 1 et 10.

22. Procédé suivant la revendication 20, caractérisée en ce que les esters et/ou les éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglycoside sont choisis parmi :

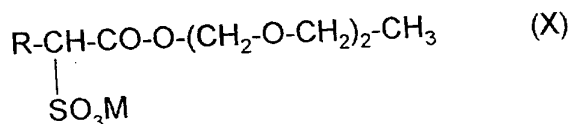
- des mélanges d'esters et/ou des mélanges d'éthers de différents acides gras d' $\alpha$ -butylglucoside dont les différentes chaînes grasses comportent, l'une par rapport à l'autre, un nombre d'atomes de carbone voisin (par exemple différent de 1 ou 2) ou,
- des mélanges de mono-, di- tri- ou polyesters et/ou des mélanges de mono-, di- tri-polyéthers d'un même acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside;

les dits esters et lesdits éthers d'acide gras d' $\alpha$ -butylglucoside utilisé(s) comporte(nt) une chaîne grasse ayant de 8 à 24 atomes de carbone.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisée en ce que les phases lamellaires comprennent en outre au moins un lipide amphiphile ionique.

24. Procédé suivant selon la revendication 23, caractérisée en ce que le lipide amphiphile ionique est choisi dans le groupe formé par :

- les sels alcalins du dicétyl- et du dimyristylphosphate ;
- les sels alcalins du cholestérol sulfate ;
- les sels alcalins du cholestérol phosphate ;
- les lipoaminoacides et leurs sels tels que les acylglutamates mono- et di-sodiques comme le sel disodique de l'acide N-stéaroyl L-glutamique commercialisé sous la dénomination Acylglutamate HS21 par la société AJINOMOTO ;
- les sels de sodium de l'acide phosphatidique ;
- les phospholipides ;
- les dérivés alkylsulfoniques notamment de formule (X) :

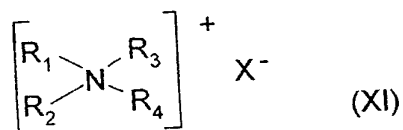


dans laquelle R représente des radicaux alkyle en C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, en particulier les radicaux C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> et C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> pris en mélange ou séparément et M est un métal alcalin ou alcalino-terreux tel que le sodium ; et leurs mélanges;

- les sels d'ammonium quaternaire, les amines grasses et leurs sels.

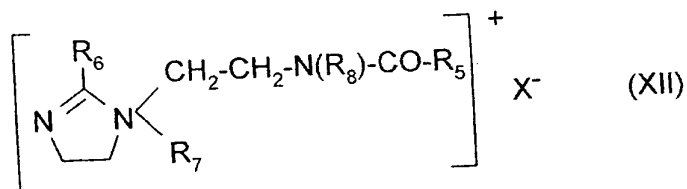
26. Procédé selon la revendication 25, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi:

- Les sels d'ammonium quaternaires représentés par la formule (XI) suivante;

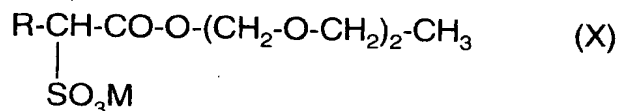


dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>4</sub>, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un radical aliphatique, linéaire ou ramifié, comportant de 1 à 30 atomes de carbone, ou un radical aromatique tel que aryle ou alkylaryle; X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)sulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates;

- les sels d'ammonium quaternaire de l'imidazolinium représentés par la formule (XII) suivante:



dans laquelle R<sub>5</sub> représente un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone par exemple dérivés des acides gras du suif, R<sub>6</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ou un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone, R<sub>7</sub> représente un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkylsulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates;



dans laquelle R représente des radicaux alkyle en C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, en particulier les radicaux C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> et C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> pris en mélange ou séparément et M est un métal alcalin ou alcalino-terreux tel que le sodium ; et leurs mélanges;

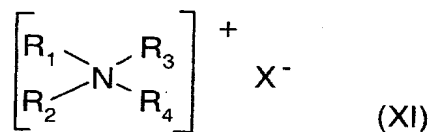
5

- les sels d'ammonium quaternaire, les amines grasses et leurs sels.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi:

10

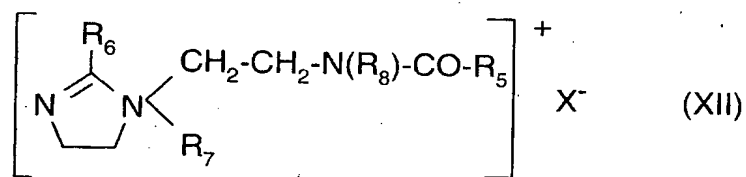
- Les sels d'ammonium quaternaires représentés par la formule (XI) suivante;



dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>4</sub>, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un radical aliphatique, linéaire ou ramifié, comportant de 1 à 30 atomes de carbone, ou un radical aromatique tel que aryle ou alkylaryle; X<sup>-</sup> est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)sulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates;

15

- les sels d'ammonium quaternaire de l'imidazolinium représentés par la formule (XII) suivante:



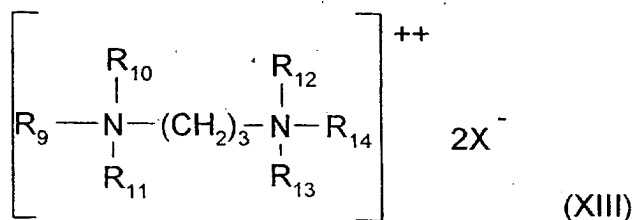
20

dans laquelle R<sub>5</sub> représente un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone par exemple dérivés des acides gras du suif, R<sub>6</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ou un radical alcényle ou alkyle comportant de 8 à 30 atomes de carbone, R<sub>7</sub> représente un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, phosphates, acétates, lactates, alkylsulfates, alkyl-ou-alkylarylsulfonates;

25

- les sels de diammonium quaternaire représentés par la formule (XIII) suivante;

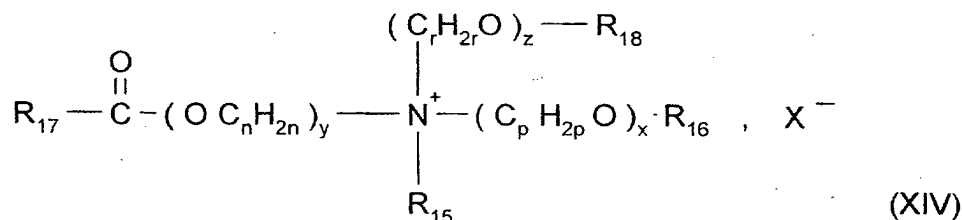
- les sels de diammonium quaternaire représentés par la formule (XIII) suivante;



dans laquelle  $R_9$  désigne un radical aliphatique comportant environ de 16 à 30 atomes de carbone,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  et  $R_{14}$ , identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène ou un radical alkyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone, et X est un anion choisi dans le groupe des halogénures, acétates, phosphates, nitrates et méthylsulfates;

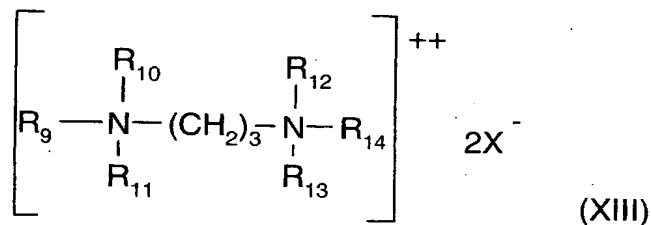
- les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester.

27. Procédé selon la revendication 25, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester répondent à la formule (XIV) suivante :



dans laquelle :

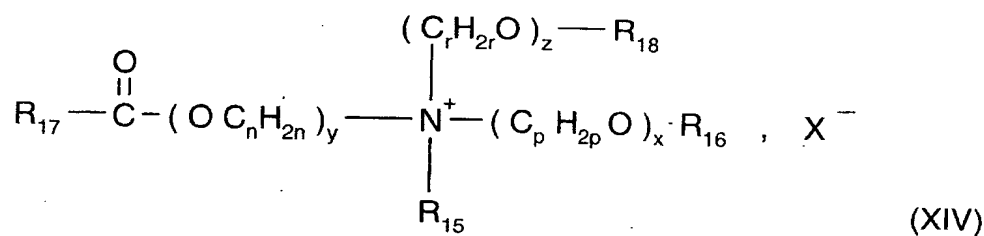
- $R_{15}$  est choisi parmi les radicaux alkyles en  $C_1$ - $C_6$  et les radicaux hydroxyalkyles ou dihydroxyalkyles en  $C_1$ - $C_6$  ;
- $R_{16}$  est choisi parmi :
  - le radical  $R_{19}$ -CO- ;
  - les radicaux  $R_{20}$  hydrocarbonés en  $C_1$ - $C_{22}$  linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
  - l'atome d'hydrogène ;
- $R_{18}$  est choisi parmi :
  - l'atome d'hydrogène ;
  - le radical  $R_{19}$ -CO- ;
  - les radicaux  $R_{22}$  hydrocarbonés en  $C_1$ - $C_6$  linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;



dans laquelle  $R_9$  désigne un radical aliphatique comportant environ de 16 à 30 atomes de carbone,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  et  $R_{14}$ , identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène ou un radical alkyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone, et  $X$  est un anion choisi dans le groupe des halogénures, acétates, phosphates, nitrates et méthylsulfates;

- les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester.

- 10 26. Procédé selon la revendication 24, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester répondent à la formule (XIV) suivante :



15 dans laquelle :

- $R_{15}$  est choisi parmi les radicaux alkyles en  $C_1$ - $C_6$  et les radicaux hydroxyalkyles ou dihydroxyalkyles en  $C_1$ - $C_6$  ;
- $R_{16}$  est choisi parmi :
  - le radical  $R_{19}$ -CO- ;
  - les radicaux  $R_{20}$  hydrocarbonés en  $C_1$ - $C_{22}$  linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
  - l'atome d'hydrogène ;
- $R_{18}$  est choisi parmi :
  - l'atome d'hydrogène ;
  - le radical  $R_{19}$ -CO- ;
  - les radicaux  $R_{22}$  hydrocarbonés en  $C_1$ - $C_6$  linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;

- R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> et R<sub>21</sub>, identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en C<sub>7</sub>-C<sub>21</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
- n, p et r, identiques ou différents, sont des entiers valant de 2 à 6 ;
- y est un entier valant de 1 à 10 ;
- 5      - x et z, identiques ou différents, sont des entiers valant de 0 à 10 ;
- X<sup>-</sup> est un anion simple ou complexe, organique ou inorganique ;

sous réserve que la somme  $x + y + z$  vaut de 1 à 15, que lorsque x vaut 0 alors R<sub>16</sub> désigne R<sub>20</sub> et que lorsque z vaut 0 alors R<sub>18</sub> désigne R<sub>22</sub>.

- 10      28. Procédé selon la revendication 27, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester correspond à la formule (XIV) dans laquelle :

- R<sub>15</sub> désigne un radical méthyle ou éthyle,
- x et y sont égaux à 1 ;
- 15      - z est égal à 0 ou 1 ;
- n, p et r sont égaux à 2 ;
- R<sub>16</sub> est choisi parmi :
  - le radical R<sub>19</sub>-CO- ;
  - les radicaux méthyle, éthyle ou hydrocarbonés en C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub> ;
  - 20      • l'atome d'hydrogène ;
- R<sub>18</sub> est choisi parmi :
  - le radical R<sub>21</sub>-CO- ;
  - l'atome d'hydrogène ;
- R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> et R<sub>21</sub>, identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés et de préférence parmi les radicaux alkyles et alcényle en C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>, linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés.
- 25

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 21 à 28, caractérisée en ce que, 30 le rapport en poids entre la quantité de lipide amphiphile non-ionique et de lipide amphiphile est compris entre 50/1 et 50/25.

30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 29, caractérisée en ce que lesdites phases lamellaires contiennent au moins un additif choisi parmi les stérols, les alcools et diols à chaîne grasse, les amines à chaîne grasse et leurs dérivés ammonium quaternaire. 35

- $R_{17}$ ,  $R_{19}$  et  $R_{21}$ , identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en  $C_7-C_{21}$ , linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés ;
  - $n$ ,  $p$  et  $r$ , identiques ou différents, sont des entiers valant de 2 à 6 ;
  - $y$  est un entier valant de 1 à 10 ;
- 5      -  $x$  et  $z$ , identiques ou différents, sont des entiers valant de 0 à 10 ;
- $X^-$  est un anion simple ou complexe, organique ou inorganique ;
- sous réserve que la somme  $x + y + z$  vaut de 1 à 15, que lorsque  $x$  vaut 0 alors  $R_{16}$  désigne  $R_{20}$  et que lorsque  $z$  vaut 0 alors  $R_{18}$  désigne  $R_{22}$ .

10    27. Procédé selon la revendication 26, caractérisée en ce que les sels d'ammonium quaternaire contenant au moins une fonction ester correspond à la formule (XIV) dans laquelle :

- $R_{15}$  désigne un radical méthyle ou éthyle,
  - $x$  et  $y$  sont égaux à 1 ;
- 15      -  $z$  est égal à 0 ou 1 ;
- $n$ ,  $p$  et  $r$  sont égaux à 2 ;
  - $R_{16}$  est choisi parmi :
    - le radical  $R_{19}-CO-$  ;
    - les radicaux méthyle, éthyle ou hydrocarbonés en  $C_{14}-C_{22}$  ;
- 20      - l'atome d'hydrogène ;
- $R_{18}$  est choisi parmi :
    - le radical  $R_{21}-CO-$  ;
    - l'atome d'hydrogène ;
- 25      -  $R_{17}$ ,  $R_{19}$  et  $R_{21}$ , identiques ou différents, sont choisis parmi les radicaux hydrocarbonés en  $C_{13}-C_{17}$ , linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés et de préférence parmi les radicaux alkyles et alcényle en  $C_{13}-C_{17}$ , linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés.

30    28. Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 à 27, caractérisée en ce que, le rapport en poids entre la quantité de lipide amphiphile non-ionique et de lipide amphiphile est compris entre 50/1 et 50/25.

35    29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 28, caractérisée en ce que lesdites phases lamellaires contiennent au moins un additif choisi parmi les stérols, les alcools et diols à chaîne grasse, les amines à chaîne grasse et leurs dérivés ammonium quaternaire.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit additif est le cholestérol.
- 5 32. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 31, caractérisée en ce que la composition qu'elle comprend au moins un autre céramide inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques, le dit céramide étant choisi parmi les céramides STAR, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5 et/ou 6.
- 10 33. Procédé suivant la revendication 32, caractérisé en ce que le céramide est choisi parmi les céramides STAR et/ou 4.
34. Procédé suivant l'une quelconques des revendications 15 à 33, caractérisé en ce que la composition contient un autre composé permettant d'améliorer la fonction barrière  
15 choisi parmi l'acide ascorbique ou ses analogues, les lécithines, les glycosphingolipides, les phospholipides, le cholestérol et ses dérivés, les phytostérols (stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol, campestérol), les acides gras essentiels, le 1-2 diacylglycérol, la 4-chromanone, les triterpènes pentacycliques tels que l'acide ursolique, la vaseline et la lanoline.
- 20 35. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 15 à 34, caractérisée en ce que la quantité de composition appliquée topiquement sur la surface des épidermes en culture est comprise entre 0.5  $\mu$ l et 10  $\mu$ l par  $\text{cm}^2$  de surface d'épiderme reconstruit.
- 25 36. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'épiderme reconstruit est le modèle EPISKIN<sup>TM</sup>.
37. Equivalent de peau ou peau reconstruite contenant au moins un dérivé de la famille du céramide 5.5 de formule (I) telle que définie dans les revendications 1 à 4, dans  
30 laquelle X représente un groupement hydrogène.



30. Procédé selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit additif est le cholestérol.

5 31. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 30, caractérisée en ce que la composition qu'elle comprend au moins un autre céramide inclus dans lesdites phases lamellaires lipidiques, le dit céramide étant choisi parmi les céramides STAR, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5 et/ou 6.

10 32. Procédé suivant la revendication 31, caractérisé en ce que le céramide est choisi parmi les céramides STAR et/ou 4.

33. Procédé suivant l'une quelconques des revendications 14 à 32, caractérisé en ce que la composition contient un autre composé permettant d'améliorer la fonction barrière  
15 choisi parmi l'acide ascorbique ou ses analogues, les lécithines, les glycosphingolipides, les phospholipides, le cholestérol et ses dérivés, les phytostérols (stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol, campestérol), les acides gras essentiels, le 1-2 diacylglycérol, la 4-chromanone, les triterpènes pentacycliques tels que l'acide ursolique, la vaseline et la lanoline.

20

34. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 14 à 33, caractérisée en ce que la quantité de composition appliquée topiquement sur la surface des épidermes en culture est comprise entre 0.5  $\mu$ l et 10  $\mu$ l par  $\text{cm}^2$  de surface d'épiderme reconstruit.

25 35. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'épiderme reconstruit est le modèle EPISKIN™.

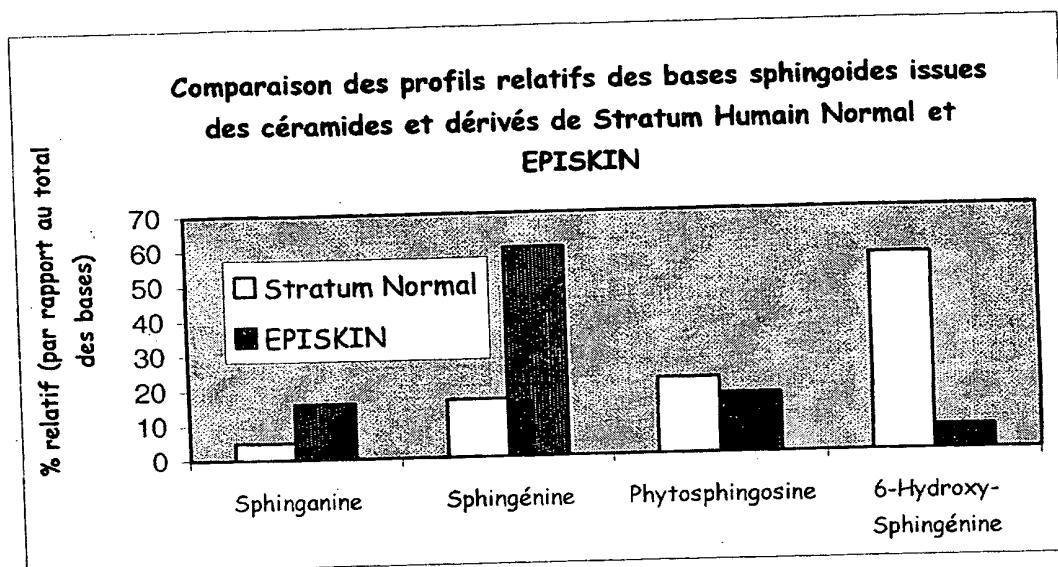
36. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que la composition correspond à l'une des compositions définies dans les revendications 15 à 36.

30

37. Equivalent de peau ou peau reconstruite contenant au moins un dérivé de la famille du céramide 5.5 de formule (I) telle que définie dans les revendications 1 à 4, dans laquelle X représente un groupement hydrogène.

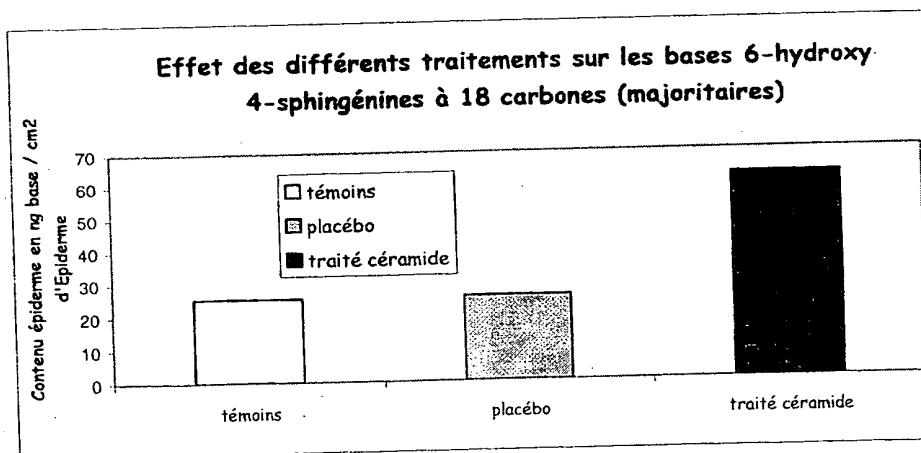
35

FIGURE 1



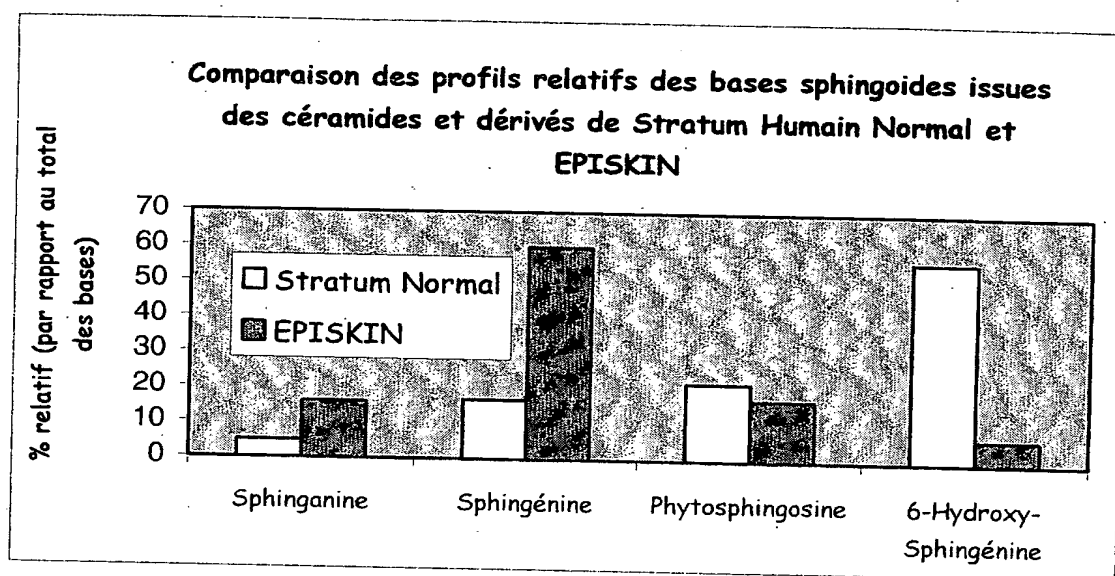
5

FIGURE 2



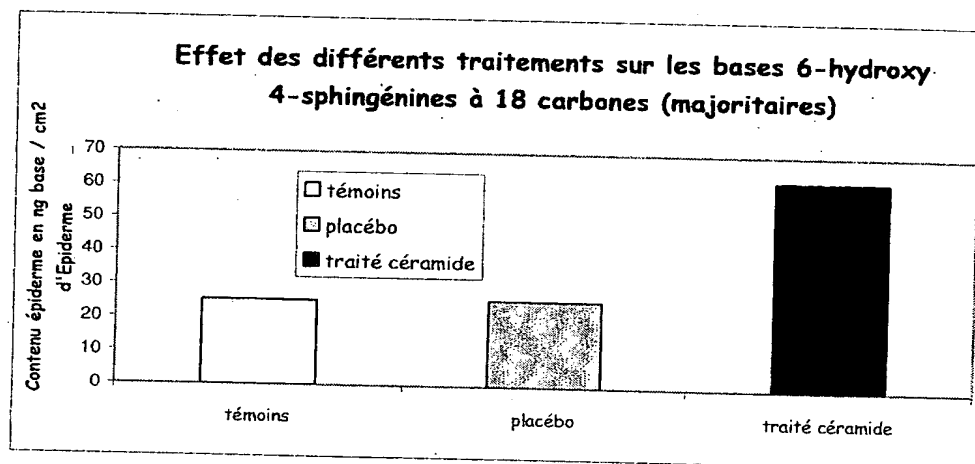
10

FIGURE 1



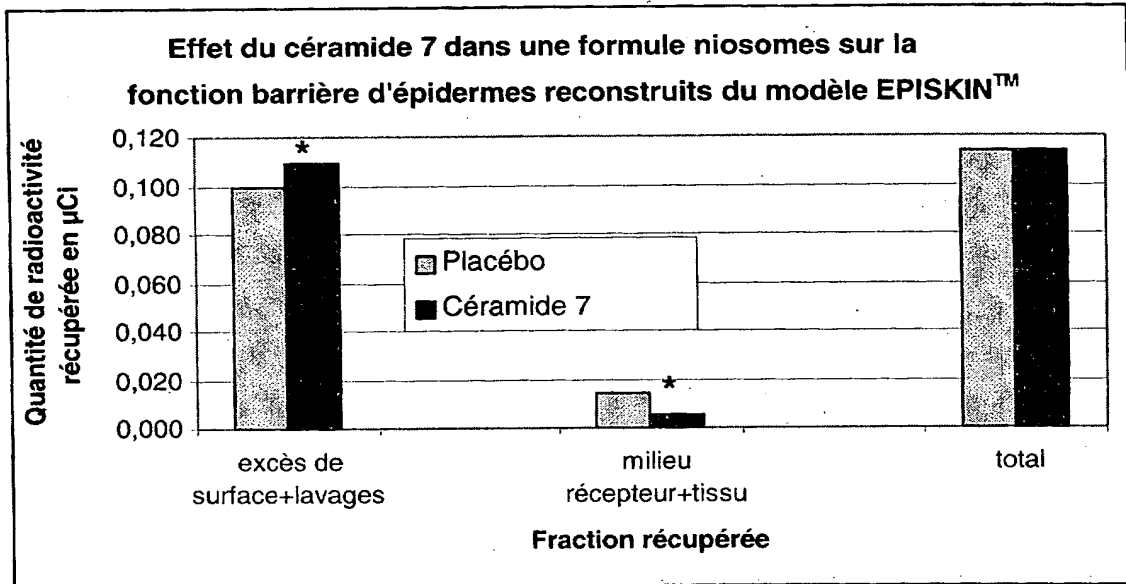
5

FIGURE 2



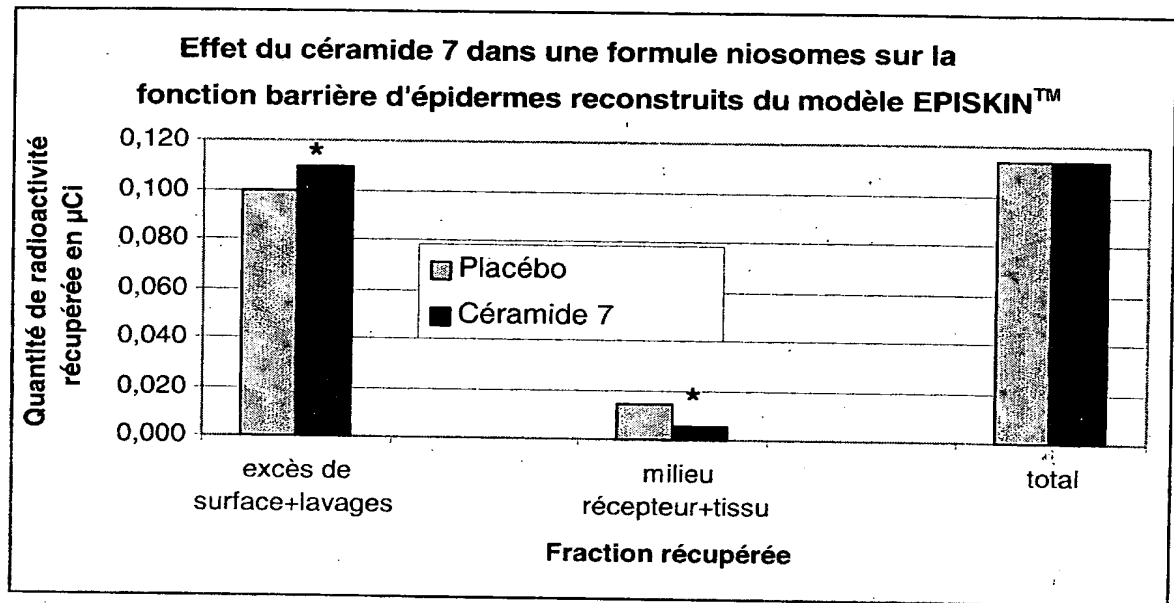
10

FIGURE 3



5 \* : Résultats significatifs à 15 %

FIGURE 3



5 \* : Résultats significatifs à 15 %



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11235\*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1./1.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		OA03024/BN/DBA	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0301058	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédés de préparation d'un épiderme reconstruit supplémenté en céramide 7 et/ou 5.5.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> L'ORÉAL 14, rue Royale 75008 PARIS France			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHOPART	
Prénoms		Mélanie	
Adresse	Rue	34, rue Santerre	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CASTIEL	
Prénoms		Isabelle	
Adresse	Rue	7, avenue Baquis	
	Code postal et ville	06000	NICE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		SIMONNET	
Prénoms		Jean-Thierry	
Adresse	Rue	24, Rue Léon Frot	
	Code postal et ville	75011	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) 16 Juillet 2003 Myriam ALLAB			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.